



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**

**Optimización de nutrición nitrogenada en hortícolas de hoja
crecidas en sistema de hidroponía pura NGS®: Uso de
inoculantes microbianos**

.....

PRESENTANDO POR:

ITXASO EQUIZA VESPERINAS

.....

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

Mayo, 2021

RESUMEN

Durante los últimos 50 años, la aplicación de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado 20 veces y se prevé que su aplicación se incremente a 180 millones de toneladas para 2030 con el objetivo de poder abastecer a la población mundial en aumento. Esto provoca que los niveles de producción tengan que ser mayores por lo que se están diseñando modelos agrícolas más intensivos, lo que conlleva a un consumo excesivo y descontrolado de fertilizantes y lo que está provocado una alteración del ciclo global del nitrógeno (N). Esta alteración está ocasionando grandes problemas ambientales como la contaminación de grandes volúmenes de agua, nocivo tanto para la naturaleza como para los seres humanos. Por ello, la agricultura tiene que tender hacia una intensificación sostenible, para alcanzarlo, se están impulsando numerosas medidas que contribuyan a paliar sus efectos. Entre los intentos de mejora, destaca el de encontrar sustitutos y/o complementos a la fertilización de N mineral, con el fin de reducir y minimizar su aplicación.

El objetivo del presente estudio, es determinar si es posible la sustitución parcial del abonado con N mineral por un abonado biológico en hortalizas de hoja crecidas en sistema de hidroponía pura NGS® mediante el empleo del bioestimulante BlueN® cuya bacteria fijadora de N es *Methylobacterium symbioticum*. Para ello, se han crecido plantas de borraja y acelga en 6 mesas de hidroponía con diferentes tratamientos. Tres de las mesas tenían un tratamiento con el bioestimulante y las otras tres no, permaneciendo como control. A su vez, dos de estas mesas contenían una solución nutritiva con alto contenido de N (12,5 mM) y las otras 4 una concentración de N bajo (1,8 mM). Por otro lado, dos de las mesas de bajo N se les realizó un tratamiento foliar con β -alanina para ver si podría mejorar la colonización de *M. symbioticum* en las plantas hortalizas de hoja. Con los resultados obtenidos, no se ha visto que el bioestimulante BlueN® tenga ningún efecto positivo sobre las plantas tratadas de borraja y acelga frente a las control. La aplicación de β -alanina sobre la superficie de las hojas se ha visto que haya mejorado ni aumentado el grado de colonización en las hortalizas de invierno.

Palabras clave: hidroponía, bioestimulante, nitrógeno, hortaliza de hoja, acelga, borraja, β -alanina, BlueN®, *Methylobacterium symbioticum*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 Material vegetal.....	9
3.1.1 Acelga (<i>Beta vulgaris</i>)	10
3.1.2 Borraja (<i>Borago officinalis</i> L).....	10
3.2 Sistema de cultivo	11
3.2.1 Bases del sistema de cultivo	11
3.3 Diseño experimental	12
3.3.1 Bioestimulante microbiano.....	12
3.3.2 β-Alanina	13
3.3.3 Disposición de los tratamientos	13
3.4 Condiciones de crecimiento.....	15
3.4.1 Condiciones climatológicas.....	15
3.4.2 Formulación soluciones nutritivas.....	16
3.4.3 Periodo de crecimiento	18
3.5 Determinaciones	20
3.5.1 Iones solubles en las soluciones nutritivas	20
3.5.2 Biomasa	20
3.5.3 Índice de clorofilas en hojas: índice SPAD (del inglés: Soil Plant Analysis Development).....	20
3.5.4 Conductancia estomática	21
3.5.5 Área foliar específica (del inglés :Specific Leaf Area).....	21
3.5.6 Contenido de N total.....	22
3.5.7 Colonización y localización de las bacterias endófitas.....	22
3.5.8 Análisis estadístico	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Aspectos técnicos positivos y negativos	25
4.1.1 Control de nutrientes	25
4.1.2 Control roedores	25
4.1.3 Control frecuencia de riego	26
4.2 Ventajas y desventajas del cultivo hidropónico NGS®.....	27
4.2.1 Ventajas	27
4.2.2 Desventajas.....	28
4.3 Parámetros soluciones nutritivas	28
4.3.1 Cationes	29
4.3.2 Aniones.....	29
4.3.3 Ph.....	29
4.4 Parámetros crecimiento.....	32
4.4.1 Borraja	32

4.4.2	Acelga.....	32
4.5	Parámetros fisiológicos	36
4.5.1	Borraja	36
4.5.2	Acelga.....	38
4.6	Colonización endófito	41
4.6.1	Estado vida libre	41
4.6.2	Colonización en borraja.....	41
4.6.3	Colonización en acelga.....	43
4	CONCLUSIONES.....	44
5	BIBLIOGRAFÍA.....	45
	<i>Anexo 1: Estadística ANOVA dos vías y una vía.</i>	<i>47</i>

1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es imprescindible para el crecimiento de las plantas terrestres considerándolo como un macronutriente esencial. (Benimeli et al., 2019) Su importancia radica en que forma parte de biomoléculas como las proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, vitaminas, aminoácidos y hormonas.

En la naturaleza, el N a pesar de ser uno de los elementos más abundantes del planeta, es uno de los nutrientes más limitante para la producción de los cultivos. Existen dos fuentes principales de reserva de N para las plantas. La principal es la atmosférica, en ella el 78% es N y se encuentra mayoritariamente en forma diatómica, por lo que queda inaccesible para la mayor parte de las plantas. Esto se debe a que la molécula N_2 es inerte con una gran estabilidad conferida por su enlace triple entre los átomos de N, impidiendo que las plantas lo puedan absorber y asimilar directamente. En el medio natural, el N_2 atmosférico puede ser asimilado por la planta por medio de tres vías: a través de bacterias que lo han fijado simbióticamente (ej. Familia de leguminosas en simbiosis con bacterias del género *Rizobium*) o asimbióticamente (ej. Bacterias fijadoras de N en vida libre del género *Azotobacter* o *Azospirillum*) o disuelto en el agua de lluvia. (Perdomo & Barbazán, 2007).

La otra reserva mayoritaria de N es la materia orgánica del suelo donde aproximadamente el 98% se encuentra formando compuestos orgánicos. El N que se encuentra en formas orgánicas no está disponible para las plantas de interés agronómico ya que absorben mayoritariamente formas inorgánicas. Por lo cual, es necesario que esa materia orgánica sufra un proceso de mineralización para pasar de formas orgánicas no disponibles para las plantas a formas inorgánicas disponibles y así poder ser asimiladas por las plantas. A pesar de la gran cantidad de N presente en el planeta, apenas un 10% del total de la fracción de N está disponible para las plantas. (Perdomo & Barbazán, 2007)

La parte radicular de las plantas absorbe el N desde el suelo generalmente como iones disueltos de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), siendo el nitrato la principal forma de absorción de las plantas (Ilustración 1). El nitrato es la forma estable de las estructuras oxidadas del N y puede ser reducido por acción microbiológica. (Antón & Lizaso, 2001) Además, de forma minoritaria y difíciles de detectar están las formas inorgánicas gaseosas de N: dióxido de nitrógeno (NO_2), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). (Benimeli et al., 2019) El nitrato tiene carga negativa por lo que no es retenido por la fracción coloidal del suelo. Esto provoca que sea un compuesto muy móvil y se desplace hacia horizontes inferiores, este proceso se denomina lixiviación. Los nitratos terminan desembocando en aguas superficiales y subterráneas lo que provoca su contaminación. La acumulación de nitratos en aguas superficiales junto con otros nutrientes como el fósforo, provoca el crecimiento desmesurado de algas y plantas acuáticas sobre la superficie del agua, esto impide que la luz penetre hasta el fondo de la masa de agua. Como consecuencia, en el fondo se disminuye la tasa fotosintética y a su vez la actividad de los descomponedores (respiración aeróbica) aumenta al recibir la materia orgánica de la superficie, este proceso se denomina eutrofización. Todo ello, provoca la anoxia de las zonas profundas causando la muerte de fauna acuática y la degradación de la calidad del agua. (Carrillo & D. Alfredo Soria Alfonso, n.d.) La eutrofización es un proceso natural de envejecimiento de los lagos que ocurre de forma lenta e independientemente de la acción humana. (Bonansea et al., 2014) Sin embargo, debido a la creciente urbanización y desarrollo agrícola se ha acelerado el proceso.

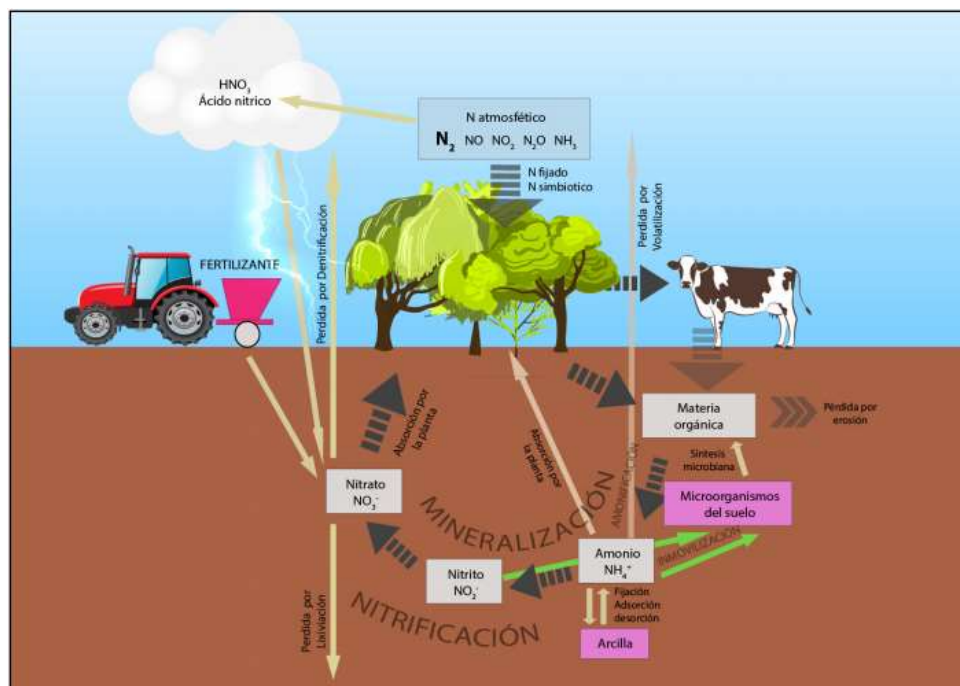


Ilustración 1. Ciclo del nitrógeno, predomina el ciclo primario (flechas grises) (Benimeli et al., 2019)

Actualmente, la población mundial se está incrementando y se están iniciando nuevas tendencias a incorporar una mayor cantidad de carne a las dietas. El ganado tiene una dieta casi en su totalidad, basada en cereales, por lo que la producción mundial de cereales se va a duplicar para el año 2050 para cumplir con las demandas de la población en aumento y los cambios en las dietas. Durante los últimos 50 años, la aplicación de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado 20 veces y se prevé que su aplicación se incremente a 180 millones de toneladas para 2030. (Verhulst et al., 2014) Al incrementar los niveles de producción se están diseñando modelos agrícolas más intensivos, lo que conlleva a un consumo excesivo y descontrolado de fertilizantes y lo que está provocando una alteración del ciclo global del nitrógeno. Esto está ocasionando grandes problemas ambientales como la contaminación de grandes volúmenes de agua, nocivo tanto para la naturaleza como para los seres humanos, causado por la contaminación difusa y directa. La contaminación difusa, generada principalmente por actividades agrícolas, es aquella contaminación no puntual generada por medio de contaminantes sin un punto de origen establecido. Su control y detección es complicado. Por otro lado, la contaminación directa es aquella de la que sí se conoce el foco origen de la contaminación.

Estas tendencias alimentarias actuales, no cumplen con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU y el Acuerdo de París, por lo cual, lo que se está buscando es la transformación a dietas más saludables a partir de sistemas alimentarios sostenibles. La sociedad tiene que acercarse a dietas más saludables con una ingesta calórica adecuada, rica en alimentos de origen vegetal, baja cantidad de alimentos de origen animal, pequeñas cantidades de granos refinados y reducir en gran medida los alimentos procesados y azúcares añadidos. Actualmente, la producción mundial de calorías sigue creciendo junto con la población, sin embargo, más de 820 millones de personas no cubren sus necesidades básicas alimentarias. Por otra parte, algunas personas consumen dietas de baja calidad que causan bajas deficiencias en micronutrientes que contribuye a un aumento de la obesidad y otras enfermedades relacionadas. (Willett et al., 2019) Además, si la densidad de población sigue en aumento se va a necesitar un 60% más de alimentos de los que se dispone actualmente. Pero ya que, la tierra cultivable es limitada, se debe proceder a una intensificación agrícola sostenible (Portal de Apoyo a Las Políticas y La Gobernanza (FAO), n.d.). La intensificación sostenible estudia paisajes, territorios y ecosistemas para optimizar la utilización y gestión de sus recursos. Lo que se busca es proteger los cultivos de forma sostenible, reducir la contaminación causada por productos químicos, gestionar la biodiversidad y los

servicios ecosistémicos y reforzar los medios de subsistencia. (*Portal de Apoyo a Las Políticas y La Gobernanza (FAO)*, n.d.) La implementación de la intensificación sostenible va a permitir para 2050 al menos una redistribución global del uso de fertilizantes nitrogenados y fósforo, reciclaje del fósforo, mayor eficiencia del uso de fertilizantes y agua, reducción de emisiones de gases de efecto invernadero y la adopción de prácticas de gestión de tierra que cambien la agricultura de una fuente de carbono a sumidero. (Willett et al., 2019). Para alcanzar la intensificación sostenible se deberían entre otras medidas introducir sistemas hidropónicos donde el cultivo es capaz de desarrollarse correctamente sin necesidad de suelo. Estos sistemas son de gran utilidad en los casos en los que se imposibilita implantar la agricultura tradicional. Además, el agua empleada se puede someter a procesos de tratamiento para su reutilización, aumentando la eficiencia en el suelo de los recursos hídricos y disminuyendo el impacto ambiental.

Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), los nitratos se encuentran de manera natural en los vegetales, principalmente en las hortalizas de hoja ancha, como las espinacas y la lechuga. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Miembros Comité Científico., 2011) El nitrato en sí mismo no es directamente tóxico, pero una vez ingerido, se reduce a ion nitrito (NO_2^-) que sí se considera tóxico. Según (AESAN) la Ingesta Diaria Admisible es de 5 mg/kg de nitrato de sodio o 3,7 mg/kg de ion nitrato. Con el objetivo de garantizar la calidad en las aguas destinadas al consumo humano está vigente la Directiva 80/778/CEE, en el que se establece el valor límite de 50 mg/L para nitratos y de 0,1 mg/L para nitritos. Los nitritos en el organismo, disminuyen la capacidad de transportar oxígeno en la sangre hacia las células, produciendo la enfermedad cuyo nombre es Metemoglobinemia. Esta enfermedad afecta especialmente a niños menores de tres meses que están expuestos a altas concentraciones de nitrato, denominándose a menudo “síndrome del bebé azul”.

Para controlar el uso de los nitratos está vigente la Directiva 91/676/CEE para la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos de origen agrícola. Establece criterios para designar como zonas vulnerables, aquellas superficies territoriales cuyo drenaje dé lugar a la contaminación por nitratos. Una superficie se considera contaminada cuando las concentraciones de nitratos superan el umbral de alarma de 50 mg/L. En Navarra según la actual Orden Foral 247/2018 se diferencian tres zonas vulnerables en la actualidad: Cuenca del Cidacos, Cuenca río Robo y Cuenca del río Ebro-Aragón. Una vez determinadas tales zonas, se deben poner en marcha programas de acción con la finalidad de eliminar o minimizar los efectos de los nitratos en las aguas. En la Orden Foral 247/2018, de 4 de octubre, de la Consejera de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local se aprueba el programa de actuación para las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de origen agrario designadas en la Comunidad Foral de Navarra, Periodo 2018-2021. Esta Orden Foral se ha realizado de acuerdo a lo previsto en el artículo 7 del Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, y de acuerdo con la Orden Foral de 22 de noviembre de 1999. A su vez, las explotaciones agrarias ubicadas en las zonas designadas como zonas vulnerables deben tener un cuaderno de explotación en el cual se registran los planes y prácticas de abonado según sus cultivos.

El interés por el medio ambiente está cada vez más presente en la vida de las personas ya que actualmente en Europa como consecuencia de la agricultura, 970 millones de toneladas de terrenos fértiles se pierden cada año, el 11% (12 millones de ha) sufre erosión y un 0,43% de la productividad agrícola se pierde cada año. (*AlgaEnergy Líder En La Biotecnología de Las Microalgas*, n.d.) Por ello, y porque con el paso del tiempo las consecuencias son cada vez mayores, se están impulsando numerosas medidas que contribuyan a paliar sus efectos. Entre los intentos de mejora, destaca el de encontrar sustitutos y/o complementos a la fertilización de N mineral, con el fin de reducir y minimizar su aplicación. Uno de estos sustitutos/complementos son los bioestimulantes, que están regulados en España actualmente por el Real Decreto 506/2013 y definidos como; “*productos que aportan a otro material fertilizante, al suelo o a la planta, sustancias para favorecer y regular la absorción de los nutrientes o corregir determinadas anomalías de tipo fisiológico.*” Los de uso agrícola operan sobre la fisiología de la planta de diferentes formas y por diferentes vías para mejorar el vigor del cultivo, rendimiento y calidad de la cosecha.

En el año 2019 el Parlamento Europeo aprobó un nuevo Reglamento Europeo de Fertilizantes, bajo el marco de la economía circular donde se pretende englobar todas las categorías de fertilizantes. Esta normativa, sustituirá al actual Reglamento 2003/2003 y entrará en vigor en julio de 2022.

El bioestimulante que se ha empleado en el presente estudio es un bioestimulante microbiano (producto fertilizante a base de microorganismos no micorrícicos) cuyo nombre comercial es BlueN® y su fabricante es la empresa Symborg. Es un producto de una sola aplicación que aumenta la rentabilidad de los cultivos sin impacto ambiental ya que permite aportar N de forma biológica al cultivo durante todo el ciclo del cultivo. A su vez es compatible con la aplicación de la mayoría de herbicidas y fungicidas y su aplicación actualmente es libre para todo tipo de agricultura. (BlueN – Ficha Técnica (LATAM) - Symborg, n.d.)

BlueN® contiene la bacteria fijadora de N *Methylobacterium symbioticum* en una concentración de 3×10^7 UFC/g sobre un material inerte respetuoso con el medio ambiente y la salud de las personas y animales. Además, consume el metanol generado durante la degradación de los grupos metilos presentes en la pectina de las hojas, reduciendo la degradación de las células de las plantas alargando así la capacidad fotosintética. Esta bacteria es un metilótrofo facultativo, estrictamente aeróbico, de pigmentación rosa y pertenece al grupo de las Gram negativas. El análisis comparativo de la secuencia del gen de ARNr 16S muestra que la cepa *Methylobacterium dankookense* SB23, a la cual se le ha dado posteriormente la categoría de especie bacteriana (*M. symbioticum*) tiene un 98,7% de similitudes con el género *Methylobacterium*. (Pascual et al., 2020) Por ello, para estudiar esta bacteria nos hemos centrado en el artículo *M. symbioticum* sp. nov., a new species isolated from spores of *Glomus iranicum* var. *Tenuihypharum*.

La aplicación del BlueN® es foliar y se realiza en las primeras fases de cultivo para obtener la máxima eficiencia del cultivo (BBCH recomendada 13-16). La bacteria *M. symbioticum* penetra en la planta a través de los estomas de las hojas y se instala principalmente en las células fotosintéticas haciendo uso del sistema enzimático de la nitrogenasa para fijación del N (Ilustración 2). El complejo enzimático bacteriano de la nitrogenasa es usado por la bacteria *M. symbioticum* que se encarga de fijar el N_2 atmosférico transformándolo en amonio y cederlo posteriormente a su hospedador, la planta. Por tanto, la planta es capaz de asimilar el amonio proveniente del N atmosférico, y cedido por su huésped (bacteria endosimbiótica), posibilitando la reducción de la aplicación de N mineral y, por tanto, evitando/disminuyendo/minimizando en último término, la lixiviación de nitrato y la degradación de los suelos. Por otra parte, la fijación biológica de N atmosférico de *M. symbioticum* consigue que la planta no tenga la necesidad de tomar la totalidad del N vía radicular disminuyendo así el gasto energético de la vía enzimática nitrato reductasa ya que convertiría menor cantidad de nitrato en amonio dentro de la planta. De esta manera, la planta puede utilizar la energía ahorrada en su crecimiento vegetal. (BlueN - Hacia Una Revolución Agrícola - *Methylobacterium Symbioticum*, n.d.)

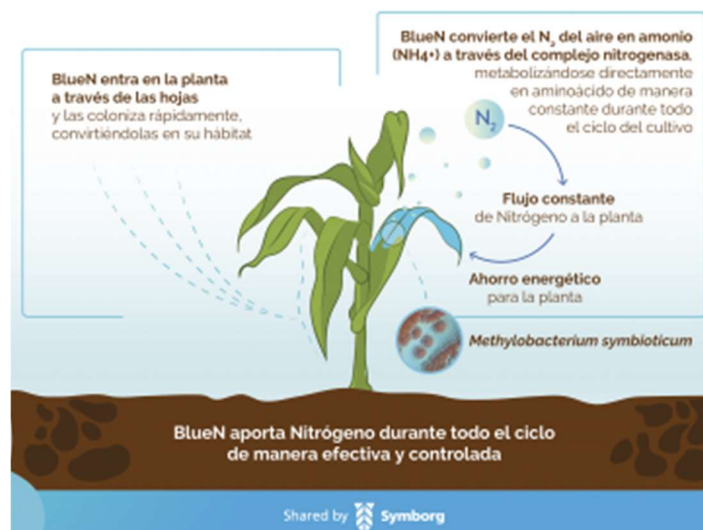


Ilustración 2 Proceso de transformación N atmosférico en amonio realizado por *M. symbioticum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

1. Determinar si es posible la sustitución parcial del abonado con N mineral por un abonado biológico en hortalizas de hoja (borraja, *Borago officinalis* L. y acelga, (*Beta vulgaris* L) crecidas en sistema de hidroponía pura NGS® mediante el empleo del bioestimulante BlueN® cuya bacteria fijadora de N es *M. symbioticum*.

2.2 Objetivos específicos

1. Puesta a punto del sistema hidropónico NGS® para cultivos hortalizas de hoja.
2. Estudio de la efectividad del bioestimulante BlueN® sobre las especies hortalizas borraja y acelga.
3. Localización de la colonización de la bacteria *M. symbioticum* en las especies hortalizas de borraja y acelga.
4. Efecto de la aplicación de β - alanina sobre la colonización de *M. symbioticum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

La fase experimental se realizó para tres hortalizas de invierno (borraja, acelga, espinaca), sin embargo, debido a un incidente provocado por roedores (Véase el apartado 4.2.1 de la parte 4 resultados) se descartó la espinaca para la discusión del experimento y por tanto de este trabajo.

3.1.1 Acelga (*Beta vulgaris*)

La acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) es una hortaliza de hoja perteneciente a la familia *Amaranthaceae* y a la subfamilia *Chenopodiaceae*. Es una planta bianual, cultivada como anual, de ciclo largo cuyo sistema radicular presenta una raíz pivotante. Sus hojas se disponen en forma de roseta y son la parte comestible. Su forma es oval, ligeramente acorazonadas, con marcados nervios que nacen desde la zona central del tallo. Durante el segundo año de cultivo emite el tallo floral, muy ramificado, con flores provistas de cáliz acrescente lo que origina una inflorescencia en glomérulo. (Ilustración 3). En Navarra, la plantación se realiza entre el 15 de agosto y el 15 de septiembre. El primer corte de hojas, que comprende parte comercial, y parte de limpieza, se realiza aproximadamente a los 50 días de la plantación. Esto permite efectuar un segundo corte a principios de diciembre. Entre el segundo y el tercer corte pueden transcurrir alrededor de 70 días, según la climatología del año.

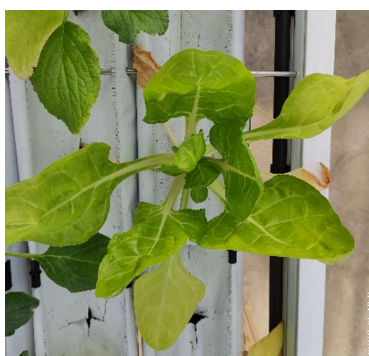


Ilustración 3. Acelga (*Beta Vulgaris* var *cicla* L.)

La acelga es originaria de las tierras del mar Mediterráneo, sur de Europa y Norte de África. El número de variedades es muy reducido, aunque su producción es muy elevada. Se clasifican dependiendo de su color, tamaño y grosor de las hojas y grado de recuperación que presenta la planta tras el corte de las hojas. Las variedades Amarilla de Lyon y Bressane son las más cultivadas en Europa y Norteamérica. La variedad empleada para este estudio ha sido la Amarilla de Lyon de hojas grandes, de forma ondulada con tonos verde claro. (Macua et al., 2007)

3.1.2 Borraja (*Borago officinalis* L)

La borraja (*Borago officinalis* L.) pertenece a la familia botánica de las *Boraginaceae*. (Ilustración 4) Es una planta anual que alcanza los 50-60 cm de altura. Las hojas son ovaladas, de inserción sésil y con pecíolos alados. Están cubiertas, como toda la planta, de unas vellosidades pinchosas. Posee una inflorescencia en cimas escorpioideas compuesta por flores de gran tamaño de color blanco. Desde el punto de vista reproductivo, es una especie alógama, ya que, para que se produzca la fecundación solo puede recibir polen de plantas de la misma especie. En ocasiones, se pueden autofecundar, sin embargo, las plantas obtenidas de estas semillas pueden mostrar depresión por consanguinidad o germinación deficiente. En Navarra la plantación se realiza en invierno y las siembras a primeros de agosto. Las siembras realizadas a partir 10 de octubre y hasta finales de enero corren el riesgo de subida a flor, lo que impide su comercialización.



Ilustración 4. Borraja (*Borago officinalis* L.)

La borraja es originaria de la cuenca mediterránea y se ha expandido por muchas zonas templadas a nivel mundial. Sin embargo, donde más se cultiva es en Norteamérica y Europa. En la base de datos del catálogo nacional de variedades comerciales y protegidas aparecen únicamente dos variedades de borraja registradas: la variedad ‘Flor Blanca’ de origen desconocido y la variedad ‘Movera’. La variedad empleada para este estudio ha sido la variedad ‘Flor Blanca’. (Giménez, 2020)

3.2 Sistema de cultivo

3.2.1 Bases del sistema de cultivo

El crecimiento del material vegetal se realizó sobre unas mesas de hidroponía pura basadas en la técnica “Nutrient Film Technique, NFT” Esta técnica consiste en la circulación constante de una lámina fina de solución nutritiva a través de las raíces del cultivo, sin pérdida o salida de la solución nutritiva, por lo que se constituye en un sistema cerrado (Carrasco et al., 1996) Estas mesas en concreto se denominan ‘Minicamp’ y están pensadas para realizar horticultura urbana y/o hacer cultivos a pequeña escala o escala piloto (Ilustración 5). El sistema de calanes New Growing System (NGS®) multibanda está patentado. Las mesas Minicamp están fabricadas por la empresa Gogarsa invernaderos S.L de Almería, España. Este soporte tiene una dimensión de 74,5x57,7x124 cm y un peso de 21 Kg. Está preparado para cultivar cualquier tipo de planta de bajo porte (preferentemente para recolección en estado vegetativo) en un espacio reducido y sin necesidad de utilizar tierra fértil. Lo único que se emplea es agua desionizada para evitar la colmatación con cal de las cañerías junto con una solución nutritiva compuesta por micro y macronutrientes.



El sistema utilizado en Minicap es una forma de cultivo que se basa en la circulación de solución nutritiva por un conjunto de 5 canales multibanda de polietileno con 11 aperturas para depositar las plantas. En uno de los extremos de la mesa cuelga un depósito de una capacidad de 12,5 L que contiene una bomba de agua y la solución nutritiva. Esta bomba permite impulsar la solución nutritiva por medio de tuberías al extremo opuesto de la mesa donde se distribuye a los canales. La solución recorre el largo de la mesa mojando la parte radicular de las plantas y finalmente se recoge de nuevo en el depósito. La bomba está conectada a un temporizador que permite programar las secuencias de riego. Al tratarse de un circuito cerrado se optimiza el agua y los fertilizantes que se aportan al cultivo en forma de solución nutritiva. (Minicap, n.d.)

3.3 Diseño experimental

3.3.1 Bioestimulante microbiano

El bioestimulante es BlueN®, contiene según la etiqueta comercial las bacterias *Methylobacterium dankookense* SB23. Sin embargo, el descubridor de esta bacteria, Symborg, recientemente le ha cambiado el nombre a *M. symbioticum*. (Pascual et al., 2020) Esta bacteria fue seleccionada entre muchas otras por expresar una alta eficiencia en la fijación de N y al mismo tiempo una alta efectividad en las condiciones de agricultura de precisión y compatibilidad con los cultivos de interés agronómico. (BlueN - Hacia Una Revolución Agrícola - *Methylobacterium Symbioticum*, n.d.)

Según la ficha técnica de BlueN®, el producto se tiene que aplicar de forma foliar y a primera hora de la mañana cuando los estomas están completamente abiertos. A su vez, se afirma que BlueN® tiene un efecto positivo en la fisiología de la planta, consumiendo el metanol generado durante la degradación de los grupos metilos presentes en la pectina de las hojas, ralentizando el envejecimiento de las células de las plantas y alargando la vida fotosintética de las mismas. Incluso, permite a la planta tener una mayor eficiencia en la utilización del N ya que aporta un N extra pudiendo reducir hasta un 60% el aporte de N orgánico e inorgánico al cultivo. Una vez aplicado el producto en los estados de desarrollo iniciales de la planta (BBCH 13-16), la bacteria penetra y la coloniza. A partir de ese punto, la bacteria comienza el proceso de transformar N_2 del aire en amonio a través del complejo nitrogenasa durante todo el periodo de desarrollo del cultivo. (BlueN – Ficha Técnica (LATAM) - Symborg, n.d.)

Por otra parte, este producto biológico cuenta con otra característica innovadora y diferenciadora con respecto a la fertilización convencional. Una vez que la planta está saturada de N, es capaz de paralizar el proceso de la nitrogenasa evitando efectos negativos de absorción excesiva que, en casos extremos, puede llegar a ocasionar la intoxicación de la planta. (BlueN - Hacia Una Revolución Agrícola - *Methylobacterium Symbioticum*, n.d.)

Gracias a todas las características descritas anteriormente, el fabricante asegura que BlueN® garantiza un suministro continuo y controlado de N a la planta de forma biológica y durante toda la fase de crecimiento. Esto supone una alternativa a la fertilización convencional en tres niveles:

1. Rentabilidad: El aporte de N de forma biológica mejora la cosecha y la rentabilidad de la fertilización nitrogenada.
2. Eficacia: Se garantiza un aporte constante y controlado de N en todos los cultivos de interés agronómico.
3. Sostenibilidad: Es una solución 100% biológica que protege el medioambiente y el agua de la contaminación por N.

3.3.2 β -Alanina

Se ha demostrado que varios metilótrofos facultativos (PPFMs) pertenecientes a *Methylobacterium* spp aislados de plantas vivas requieren vitaminas B, en concreto ácido pantoténico (vitamina B5) para su crecimiento mínimo.(Yoshida et al., 2019) A su vez, se ha determinado que estas especies de *Methylobacterium* spp, auxotrófas para la Vitamina B5, no puede sintetizar β -alanina, uno de sus precursores. Este es sintetizado por una reacción de condensación de pantoato y β -alanina. De tal forma que, con la adición de β -alanina u otros precursores del pantotenato se restaura el crecimiento de la *Methylobacterium* sp en medio mínimo. En este mismo estudio se ha comprobado que pantotenato-auxotróficos PPFMs pueden colonizar simbióticamente la superficie de las hojas de las plantas mediante la adquisición de β -alanina u otros precursores, además del pantotenato (Ilustración 6) Por tanto, se ha introducido esta variable para ver si podría mejorar la colonización de *M. symbioticum* en las plantas hortícolas de hoja.

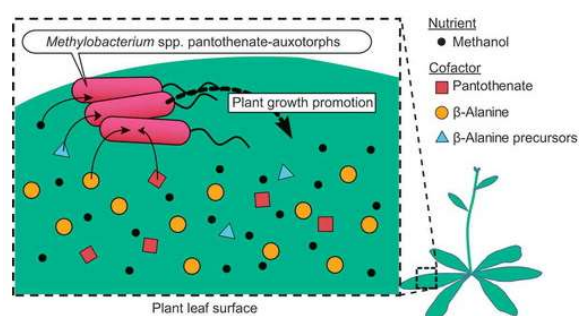


Ilustración 6. *Mathylobacterium* spp colonizando la superficie de una hoja de planta.

3.3.3 Disposición de los tratamientos

El objeto de este estudio es determinar la eficiencia de del bioestimulante BlueN® como fijador de N y optimizar la nutrición nitrogenada en hortalizas de invierno. Para ello, se han empleado 6 mesas de hidroponía pura en el interior de un invernadero de la finca de prácticas del Sario de la Universidad Pública de Navarra (UPNA).

Este diseño se ha realizado en mesas de hidroponía debido a que permite controlar qué nutrientes se le aporta a la planta y en qué concentración. A su vez, se eliminan todas las interacciones que la planta tiene en cultivo bajo suelo y así es posible comprobar la efectividad del bioestimulante.



Ilustración 7. Disposición experimento

En la Ilustración 7 se puede ver el croquis de cómo están distribuidas las mesas en el invernadero y con qué tratamiento cada una. Las mesas 1 y 2 tienen un tratamiento de β -alanina realizado el 28 de febrero mediante un aerógrafo con una boquilla de 5mm. Lo que se buscó con la aplicación de β -alanina fue comprobar si había una mayor proliferación de la bacteria y si se mejoraba la colonización de la hoja por parte de la bacteria *M. symbioticum*. Esto adquiriría mayor importancia en aquellos tratamientos que contenían una concentración de bajo N (1,8 mM) ya que el efecto de la bacteria era más necesario. La aplicación se realizó a dos de las mesas; una a la que próximamente se la iba a aplicar el bioestimulante y la otra que iba a actuar como control. Para la aplicación se preparó una disolución de 0,5 L de β -alanina a una concentración de $45\mu\text{M}$. Se pulverizó las hojas de cada planta aproximadamente con un 1 ml de esa disolución.

Las mesas pares (2,4,6) tienen un tratamiento con el bioestimulante BlueN®, a diferencia de las mesas impares (1,3,5) que no tienen tratamiento y por ello sirven de control. La aplicación del bioestimulante se realizó el 29 de febrero, un día después de la aplicación de la β -alanina para que la planta sea capaz de asimilar ambos tratamientos. Según las instrucciones del bioestimulante el tratamiento se debe hacer cuando las plantas estén en un estado fenológico BBCH de 13-16, es decir, cuando tiene entre 3 y 6 hojas verdaderas completamente expandidas. Por ello, la aplicación se hizo cuando las plantas tenían completamente expandidas 7-8 hojas en la acelga y 5-6 en borraja y espinaca. La aplicación se retrasó ligeramente según las recomendaciones establecidas debido a que sobre el material vegetal se encontraron pulgones por lo que fue necesario realizar una aplicación de insecticida.

Según Pascual et al., 2020, por planta es necesario aplicar $1 * 10^6 \text{ UFC}$ para que se produzca una buena colonización en la planta. Un gramo del bioestimulante contiene $3 * 10^7 \text{ UFC}$, por lo cual es necesario aplicar a cada planta 0,33g. El experimento contaba con un total de 132 plantas a tratar, por tanto, se utilizaron 5,5 g y se diluyeron en 180 ml de agua desionizada. De forma aproximada, se aplicaron 1,3 ml sobre cada planta empleando un aerógrafo con una boquilla de 5 mm. Para la aplicación se empleó mascarilla y pantalla para evitar la inhalación del producto. A su vez, para evitar la contaminación vía aéreo de las mesas de hidroponía que estaban como control se cubrieron con plásticos negros durante todo el tiempo de aplicación a su vez las mesas a tratar se retiraron a una esquina del invernadero (a una distancia aproximada de 10 m). (Ilustración 8) Los tratamientos se administraron con movimientos longitudinales sobre el haz y el envés de cada una de las hojas de la planta (Ilustración 9).

Además, para que la planta tuviera mayor necesidad de establecer simbiosis con la bacteria a las mesas del 1 al 4 se les aplicó una solución nutritiva con bajo N (1,8 mM) y a las mesas 5 y 6 una solución nutritiva con un alto contenido en N (12,5 mM).



Ilustración 8. Cubrición mesas control para evitar contaminación área.



Ilustración 9. Aplicación del bioestimulante

3.4 Condiciones de crecimiento

3.4.1 Condiciones climatológicas

Para determinar las condiciones climáticas en las que creció el material vegetal se midió la humedad relativa, temperatura y radiación PAR. Para ello, se empleó las sondas de temperatura y de humedad que tiene el propio invernadero. Además, para evitar que las plantas bajaran de su cero vegetativo (5-6°C acelga y 8-10°C borraja) se programó el sistema de calefacción para que la temperatura del interior no bajara de los 8°C. Los datos de humedad y temperatura son tomados diariamente. (Gráfico 1A). La humedad relativa se mide en porcentaje y la temperatura en grados Celsius o Fahrenheit.

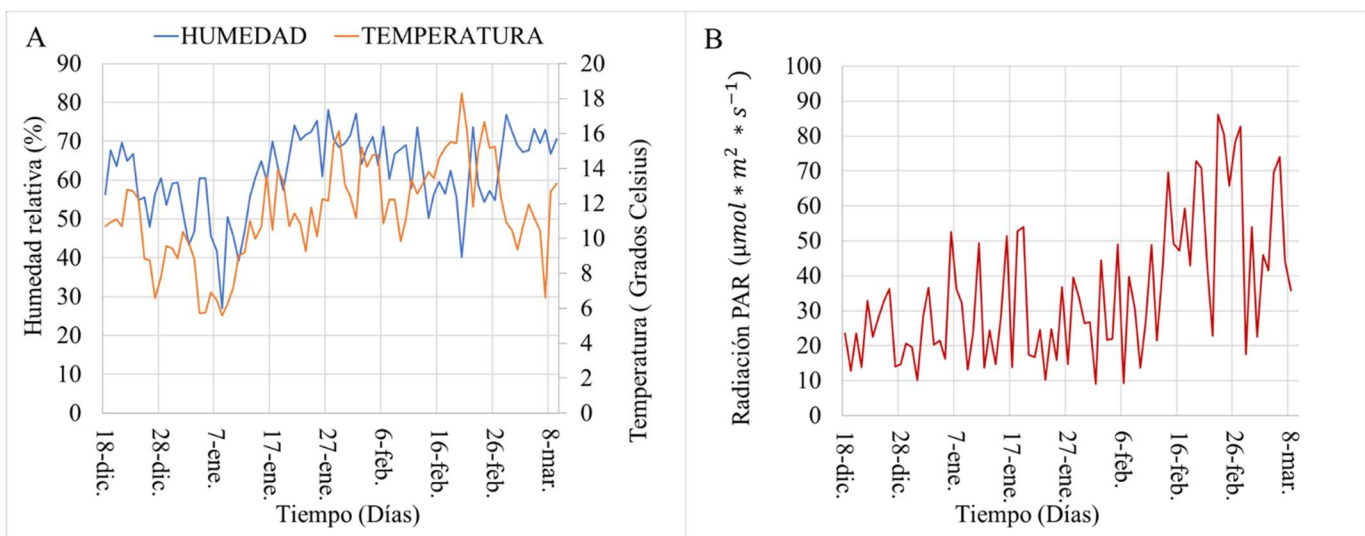


Gráfico 1. (A) Humedad relativa, temperatura. (B) Radiación PAR

Para que la fotosíntesis se realice adecuadamente es necesaria la humedad, ya que, si la planta pierde demasiada agua los estomas se cierran provocando una disminución/cese de la fotosíntesis. Esto es así, porque al cerrarse los estomas se deja de absorber CO_2 , compuesto imprescindible para la fotosíntesis. Además, las plantas transpiran, evaporación del agua, como mecanismo de refrigeración. Esta transpiración se realiza a través de los estomas, por lo cual, si los estomas permanecen cerrados la temperatura de la planta ascenderá rápidamente. La humedad relativa óptima de borraja ya acelga es de 60-80%.

Los datos de radiación PAR (Gráfico 1B) se obtuvieron a partir de los de radiación global de la base de datos de Meteonavarra donde se usó la estación automática de Pamplona (ETSIA) UPNA. La radiación global ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) es la energía que llega a la atmósfera emitida por el sol en forma de radiación electromagnética. Se mide mediante el sensor piranómetro, se tiene que orientar al sur y en un lugar libre de sombras. (Radiación Solar - Meteo Navarra, n.d.) La radiación PAR, radiación fotosintéticamente activa, es la cantidad de energía comprendida en el rango de longitudes de onda entre los 400 y 700 nm y es capaz de producir actividad fotosintética en los organismos fotosintéticos (ej.; plantas, microalgas y bacterias). La unidad de medida es la ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Para la conversión de radiación global a radiación PAR hay que tener en cuenta que alrededor del 45% de la radiación global está comprendida entre los 400 y 700 nm por lo cual se asume que $1(\text{W} \cdot \text{m}^{-2}) \approx 2,1(\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$. (García-Rodríguez et al., 2020)

3.4.2 Formulación soluciones nutritivas

A excepción del oxígeno y del carbono, que son tomados por la planta del aire, el resto de macro y micronutrientes son obtenidos del agua, disueltos en forma iónica a través de la absorción radical. En este experimento se han empleado dos soluciones nutritivas; la suministrada por la casa comercial de las mesas de hidroponía donde hay una suficiencia de N (12,5 mM) que se va a denominar solución 1 y otra de creación propia con bajo N (1,8 mM) que se va a denominar solución 2.

La solución 2, fue preparada con agua desionizada y con una baja concentración de N, fue basada en la solución nutritiva 1. De la solución 1 solo se conocían las concentraciones a las que estaba cada elemento, no se conocían los iones. Por ello, nos basamos en una formulación parecida establecida por (Olaetxea et al., 2015), se usaron algunos de los compuestos a las concentraciones de la solución 1 y la concentración de N se redujo a 1,8 mM. Para determinar qué elementos y a que concentración se encontraban cada uno de ellos en la solución 1, se cogieron 6 muestras y se llevaron a analizar al Servicio de ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia, España. La composición de elementos de la solución 1 fue determinada por espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés) La Tabla 1 muestra las concentraciones y los elementos que contiene cada una de las disoluciones.

Tabla 1. Composición soluciones nutritivas

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN Solución 1	CONCENTRACIÓN Solución 2
MACRONUTRIENTES (mM)		
K	5,24 *	4,38
Ca	4,64	3,03
Mg	1,53	1,23
P	2,09	1,66
S	2,08 *	4,67
N	12,5	1,80
MICRONUTRIENTES (µM)		
Al	1,58	0,98
B	20,81	15
Cu	2,24	1,16
Fe	30,11	15
Mn	25	11
Mo	0,57	0,42
Rb	0,35	0,17
Si	0,001	19,68
Sr	0,97	0,48
Zn	4,51	2,76
Na	336,9	101,93

*Solución nutritiva con el aporte de 30 ml de K_2SO_4 0,6 mM.

Para la preparación de la solución nutritiva 2, fue necesario separar los compuestos en tres tanques diferentes, debido a la incompatibilidad de ciertos compuestos de la solución de macronutrientes. Los tanques se denominaron tanque A, B y C (Tabla 2), los cálculos de los tanques A y B se realizaron para capacidad de 17 litros, la solución estaba 10 veces concentrada. Los cálculos del tanque C se realizaron para 1 litro donde la disolución estaba 1 M.

Tabla 2. Disposición compuestos solución 2

COMPUESTOS TANQUE A	COMPUESTOS TANQUE B	COMPUESTOS TANQUE C
K_2HPO_4	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
K_2SO_4	$CaCO_3$	
$MgSO_4 \cdot 4 H_2O$		
$(NH_4)_2SO_4$		

La solución de micronutrientes de la Solución 2 (Tabla 3), fue preparada con agua desionizada en dos botellas. En una de las botellas se introdujo todos los compuestos excepto el EDTA-Fe que se introdujo en una botella de color topacio debido a que es fotosensible. Los cálculos de ambas botellas se realizaron para un litro de disolución y estaba 1000 veces concentrada.

Tabla 3. Micronutrientes solución 2

MICRONUTRIENTES
Na_2MoO_4
$CuSO_4$
HBO_3
$MnSO_4$
$ZnSO_4$
EDTA-Fe

Los cambios de disolución se realizaron semanalmente cogiendo muestra tanto de la disolución a cambiar como de la nueva disolución de cada una de las mesas para determinar el pH y concentración de las sales minerales (Tabla 1). Los 4 tratamientos que requirieron una concentración de N baja se le adjudicó la solución nutritiva 2 y la los otros 2 tratamientos con un alto contenido en N la solución 1.

El valor del pH de un medio informa del carácter básico o ácido del mismo. La solubilidad de los iones está afectada por el pH de la solución. Las soluciones nutritivas han de ajustarse a un pH comprendido entre los valores de 5,5 y 6,5. Durante el cambio de solución del día 42 se analizó el pH de las 2 disoluciones para comprobar si se encontraban en ese rango de valores. Se obtuvo un $pH \approx 7,2$, muy básico en comparación con la solución 1, por lo cual en cada cambio de disolución fue necesario equilibrarlo a un pH de 6. Para ello, se añadió ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 30% en un bote y con ayuda de un pHmetro se fueron añadiendo gotas de H_2SO_4 hasta alcanzar el pH deseado (Ilustración 10). La solución 1 tiene una concentración en potasio y azufre menor a la solución 2 por lo cual era necesario en cada cambio de disolución añadir 30 ml de K_2SO_4 0,25 M en 12,5 L de agua para obtener una concentración final de 0,6 mM en la solución 1.



Ilustración 10 Regulación pH en cambios de soluciones nutritivas

3.4.3 Periodo de crecimiento

La germinación de las semillas se realizó en el vivero Agrotafalla S.L. Las plántulas se trajeron al invernadero de la finca de prácticas de la ETSIAB (ubicada en el edificio del Sario UPNA, Pamplona) el 15 de diciembre, se colocaron sobre unas bancadas con riego por aspersión durante una semana. El hecho de cultivar en un ambiente cerrado ha permitido que las plantas crezcan en unas condiciones climáticas favorables y reducir la incidencia de plagas y enfermedades.

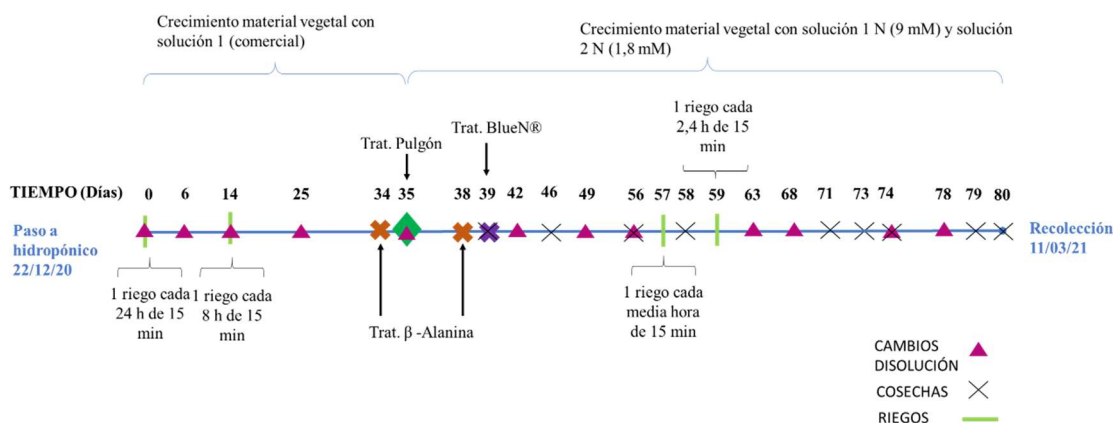


Ilustración 11. Línea temporal del experimento

En la Ilustración 11, está proyectado todas las intervenciones que se han llevado a cabo a lo largo del experimento. Se ha considerado como tiempo 0 el día en el cual las plántulas son trasladadas a hidropónico y como tiempo final 80 cuando se cosecha todo el material vegetal. En esta línea temporal está representado, riegos con su frecuencia, cambios de disolución, cosechas y tratamientos de β -Alanina, BlueN® y pulgón. Las “llaves” de la Ilustración 11 indican cuando se realizan los cambios de riego, por tanto, se aplica la misma frecuencia de riego cada día hasta que aparece la siguiente “llave” (ej. se aplica un riego cada 24 h de 15 min hasta el día 14 que a partir

de ahí se aplica 1 riego cada 8 h de 15 min). Las frecuencias de riego se fueron aumentando gradualmente ya que las necesidades hídricas cada vez fueron mayores

A su vez, se observa, que del día 0 a 35 las plantas crecieron homogéneamente con la solución 1 (comercial). A partir del día 35, partiendo del estado fenológico recomendado para la aplicación del tratamiento de BlueN® y con un tamaño homogéneo de todas las plantas de las distintas mesas, se aplicaron los tratamientos. El 35 día, aplicación de tratamientos nitrogenados y aplicación del fitosanitario anti-pulgón, el día 38 la aplicación de la β - alanina y el 39, aplicación del BlueN®.

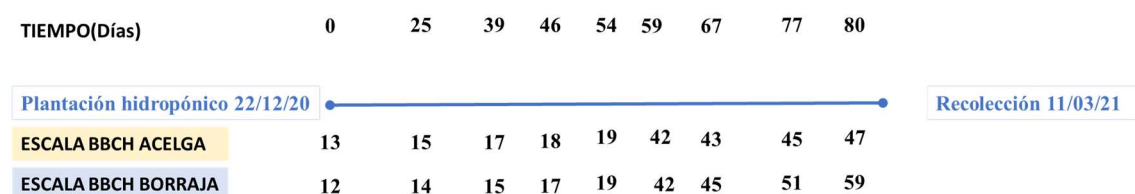


Ilustración 12. Escala BBCH para las especies de borraja y acelga

En la Ilustración 12, está representado el estado fonológico de las especies de borraja y acelga según la escala BBCH. Es un sistema de codificación uniforme que permite determinar el estado fenológico para todas las especies mono- y dicotiledóneas. El ciclo completo de desarrollo se subdivide en 10 fases de crecimiento claramente distinguibles, son descritos usando números del 0 al 9 en orden ascendente. (Meier et al., 1998). En este experimento se ha llegado en acelga hasta el estadio principal 4 que corresponde con el desarrollo de las partes vegetativa cosechables. En la borraja, sin embargo, se cosechó en el estadio 5, correspondiente con la aparición del órgano floral.

El 22 de diciembre, las plántulas (acelga, borraja, espinaca) fueron trasladadas a las mesas de hidroponía pura también colocadas en el interior del invernadero. El estado fenológico en el que se realizó el trasplante para la acelga fue de 3-4 hojas verdaderas y para la borraja y espinaca 2-3 hojas verdaderas. Las plántulas fueron introducidas junto con el cepellón de turba y fueron envueltas con un filtro para evitar obstrucciones del sistema hidropónico. Se regaron con solución nutritiva durante las 2 primeras semanas de crecimiento cada 24 h durante 15 minutos. La solución nutritiva utilizada durante los primeros 35 días después de la implantación en hidropónico fue la solución 1 preparada con agua desionizada, desde el 22 de diciembre 2020 hasta el 25 enero 2021. De esta forma el crecimiento de las plantas fue homogéneo entre mesas, hasta que las plantas alcanzaron el estado fenológico recomendado para la aplicación del producto comercial BlueN®. En dicho momento (25 enero 2021), con un tamaño homogéneo de todas las plantas de las distintas mesas, se aplicaron los tratamientos. El 25 enero, aplicación de tratamientos nitrogenados y aplicación del fitosanitario anti-pulgón. 28 enero aplicación de la β - alanina y 29 enero, aplicación del BlueN®.

La disposición de las plantas en mesas es la siguiente (Ilustración 13) cada mesa contiene 5 filas, dos están ocupadas por borraja, dos por espinaca y una por acelga. A su vez, cada una de las filas contiene 11 plántulas. Los cambios de disolución nutritiva se realizaron semanalmente dado que al haber una gran densidad de plantas se agotaban los recursos, especialmente N (ver Figura 1 y 2)



Ilustración 13 Disposición de las especies en las mesas de hidroponía

3.5 Determinaciones

3.5.1 Iones solubles en las soluciones nutritivas

El contenido de iones solubles se extrajo a partir de muestras de las dos soluciones nutritivas (solución 1 y solución 2) en cada cambio de solución, tanto en la entrante como la saliente.

Se empleó un equipo 940 Professional IC Vario 2, Metrohm (Suiza). Para la determinación de cationes (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+) de las muestras se empleó una columna Metrosep C6, 150/4.0 (Metrohm). Como eluyente se empleó una solución de ácido nítrico 1,7 mM y ácido dipicolínico 1,7mM. La medida se realizó por conductividad, con un flujo de 0,9 ml por minuto a una temperatura de 45°C. Para la determinación del contenido de aniones (NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) de las muestras se empleó una columna Metrosep A Supp7, 150/4.0 (Metrohm). Como eluyente se empleó una solución de carbonato sódico 3,60 mM. La medida se realizó por conductividad, con un flujo de 0,7 ml por minuto a una temperatura de 45°C.

3.5.2 Biomasa

En el periodo crecimiento de la borraja se realizaron 6 cosechas, en los días 39, 46, 58, 71, 73 y 79 desde el paso a hidropónico. En el de la acelga se realizaron 4 cosechas, en los días 39, 46, 56 y 80 desde el paso a hidropónico. En cada una de las cosechas se separó y se pesó la parte aérea y la radicular de cada planta. Una parte del material, se mantuvo en una estufa a 75-80°C durante 72 h para obtener el peso seco. El resto del material vegetal fue muestreado y congelado en N líquido con la mayor rapidez posible y almacenado a -80°C para su posterior análisis.

3.5.3 Índice de clorofilas en hojas: índice SPAD (del inglés: Soil Plant Analysis Development)

Para medir el índice de clorofila en hojas, se empleó un medidor de clorofila portátil Minolta® SPAD 502 (Japón). Este aparato es un colorímetro que mide la absorbancia a dos longitudes de onda, la roja (600-700 nm) e infrarroja (940 nm). Utilizando estas dos absorbancias, el medidor

calcula un valor numérico SPAD que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. La clorofila presente en las hojas de las plantas está estrechamente relacionada con el estado nutricional de las mismas. Las señales se procesan por el equipo y en la pantalla aparece un valor adimensional que se ha relacionado con el estado nutricional de la planta.(da Cunha et al., 2015)

En cada momento, la medición se hizo en la primera hoja completamente expandida de cada una de las especies, borraja y acelga. Se comenzaron a tomar medidas sobre las plantas vivas el día 39 que corresponde con la aplicación del microorganismo y se fueron tomando datos cada dos días.

3.5.4 Conductancia estomática

Para calcular la conductancia estomática, se empleó un porómetro AP4 de Delta T services (Reino Unido). El medidor contiene una pinza con una cámara donde se introduce la hoja. La conductancia estomática (gs) mide el intercambio de dióxido de carbono y vapor de agua entre la atmósfera y las hojas, esto permite determinar la eficiencia y la cantidad con la que se utiliza el agua (Kim et al., 2007).

Este equipo realiza las mediciones mediante la técnica de difusión difusa donde la conductividad se mide a través de lecturas de presión de vapor y el flujo de vapor sobre la superficie de la hoja. Este proceso se realiza a través de una bomba que introduce aire seco hasta la cámara haciendo disminuir la humedad relativa (HR) en el interior de la misma en un 5%. En este momento, la hoja libera vapor de agua y hace que la humedad relativa aumente hasta 2,3 puntos sobre la HR establecida. El Porómetro mide el tiempo que tarda la HR en ascender desde la fijada hasta 2,3 veces por encima de la misma. Este tiempo se relaciona mediante una serie de algoritmos con la resistencia estomática, que es la inversa de la conductancia estomática. La medición se hizo sobre la planta viva el día 75 desde el inicio del experimento y se midió la porosidad de la primera hoja expandida de las especies acelga y borraja. Se midieron 4 plantas por cada tratamiento. Antes de realizar la medición se calibró el porómetro en el invernadero y se obtuvo una curva de error de 27,7%.

3.5.5 Área foliar específica (del inglés :Specific Leaf Area)

El Área Foliar Específica (AFE) o en inglés specific leaf area (SLA), se mide como la superficie por unidad de peso seco, cuyas unidades son m^2/kg peso seco. La medición en borraja se realizó el día 72. Se obtuvo de cada tratamiento 3 plantas, es decir 18 plantas en total. A cada una de las plantas se le extrajo con un sacabocados 10 discos de las hojas de $9,62cm^2$. Posteriormente se introdujeron los discos en una estufa a $75^\circ C$ durante 72 horas y se pesaron los discos secos en una balanza de precisión. Para finalizar, se sumaron las áreas de los discos de cada planta y se dividieron por el peso seco obtenido para obtener el SLA. Con el SLA podemos determinar la diferencia de “grosos” foliares entre los diferentes tratamientos, ya que, cuanto más elevado sea el número más delgada es la hoja y cuanto más pequeño sea el número más gruesa. La medición en acelga se realizó el día 80, se obtuvo de cada tratamiento 3 medias plantas y se siguió el mismo procedimiento que para la borraja.

Por otra parte, teniendo este dato del SLA, se estimó el área total foliar de la siguiente manera, se sumó el peso seco de los discos al peso seco de los restos de hoja del SLA para cada planta y a la suma de peso seco total de hojas en gramos se multiplicó por el dato de SLA en cm^2/g peso seco.

3.5.6 Contenido de N total

Las muestras de peso seco de borraja y acelga fueron molidas en el laboratorio en un molino mezclador de bolas MM 400 (Retsch, GmbH, Alemania). Este molino tiene dos brazos donde van colocados los frascos de la molienda y cuando el molino está en funcionamiento debe tener colocado los dos frascos de idéntico tamaño y bolas. Los frascos de molienda realizan oscilaciones radiales en una posición horizontal. Las bolas debido al movimiento cogen inercia e impactan con gran energía sobre el material de la muestra.

Para la molienda de las muestras se emplearon dos frascos uno para la parte aérea de las plantas y otra para la radicular. Antes de empezar a moler se tuvieron que limpiar los frascos y las bolas con arena de mar. Se introdujo arena junto con las bolas en el molino y se agitaron durante un minuto. Este proceso se repitió entre muestras de los diferentes tratamientos para evitar la contaminación de muestras. Una vez molidas todas las muestras, se introdujeron a una estufa a 40°C para evitar que las muestras adquirieran humedad.

Para analizar el contenido de N total en las muestras se enviaron las muestras secas y molidas a la Unidad de Técnicas de Análisis Instrumentales (UTAI) del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de la Coruña (Galicia, España). Se analizaron mediante un analizador elemental de tipo Carlo Erba 1108 CHNS-O. Las muestras se introdujeron en cápsulas de estaño que combustión mediante una inyección de oxígeno en el analizador elemental a 1020°C, este tipo de combustión se conoce como combustión flash o combustión de Dumas.

3.5.7 Colonización y localización de las bacterias endófitas

Para determinar en qué lugar de la planta coloniza la bacteria *Methylobacterium Symbioticum*, se han realizado diferentes pruebas, mediante microscopio electrónico de barrido realizado en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la UPNA y microscopía electrónica de barrido en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Coruña (Galicia).

El microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés: Scanning Electron Microscopy), utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes.

- *Crecimiento en vida libre y observación por SEM (UTAI del SAI de la Universidad de la Coruña)*

Para los medios de cultivo líquido y sólido “óptimos” se ha basado en los artículos: para la composición de macronutrientes (Pascual et al., 2020), para la composición de micronutrientes (Green, 2015) y para la de la solución vitamínica (Urakami & Komagata, 1984). En la Tabla 4 están mostrados los macronutrientes, micronutrientes y solución vitamínica empleada para la realización de los medios, se preparó de cada uno de ellos un litro. Con todo, se preparó 1 L de medio líquido y otro de medio sólido, se mezcló el litro de los macronutrientes con 2ml de micronutrientes y 1ml de solución vitamínica, de tal forma que las concentraciones fueron 1x en los macronutrientes, 500x en los micronutrientes y 1000x para la solución vitamínica. Este procedimiento también se siguió para el medio sólido añadiendo 12 g de Agar. El cultivo en vida libre es parte de la fase experimental del TFM de Haizea Diez de Ulzurrun (estudiante de Máster de Agrobiología Ambiental).

Tabla 4. Composición medio líquido y sólido

COMPOSICIÓN MEDIO					
Macronutrientes		Micronutrientes		Sol. Vitaminica	
Compuesto	Concentración (mM)	Compuesto	Concentración (μM)	Compuesto	Concentración (mM)
Metanol	20 ml	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3,7	Biotin	0,011
$NaNO_2$	5,9	$(NH_4)_2SO_4$	3,7	Patotenato de calcio	0,84
$MgSO_4$	2	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	20	Vitamina B6	1,95
K_2HPO_4	6,8	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	13	Vitamina B1	1,19
$FeSO_4$	0,035	$Na_2MoO_4 \cdot 5H_2O$	41	Ácido 4-aminobenzoico	1,46
$CaCl_2$	0,068	H_3BO_3	160	Ácido fólico	0,005
KCl	6,7	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	240	Inositol	11,10
		$CoCl_3$	4,9	Vitamina B3	3,25
				Vitamina B2	0,53

- **Muestras SEM (Servicio de Apoyo a la Investigación UPNA)**

Para obtener las muestras a analizar en el microscopio electrónico de barrido se cosecharon hojas de borraja de dos tratamientos, una con colonización del microorganismo y otra sin colonizar. Además, se obtuvieron dos hojas de cada planta, una vieja y la otra joven para determinar si los microorganismos habían sido capaces de colonizar la totalidad de la planta. Las muestras tenían que estar completamente deshidratadas por ello, se sometieron las hojas a 5 inmersiones de 15 min en etanol a diferentes concentraciones. (Ilustración 14) Las inmersiones fueron graduales de menor a mayor concentración de etanol (10%,30%,50%,75%,100%). El estado final se puede observar en la Ilustración 15.

Las muestras se desecaron a gran velocidad lo que produjo que las estructuras se deformaran impidiendo su identificación y dificultando diferenciar con cierto rigor los microorganismos. De este modo, se realizó un segundo muestreo donde se introdujeron hojas frescas jóvenes con tratamiento de microorganismos en una estufa con sulfato de sodio anhidro durante 12 h. Este compuesto tiene propiedades higroscópicas, por tanto, es utilizado como desecante.



Ilustración 15. Deshidratación material vegetal



Ilustración 14. Material vegetal deshidratado

- **Muestras SEM (UTAI del SAI de la Universidad de la Coruña)**

El material vegetal fue enviado al Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de la Coruña. El material vegetal fue cortado, seleccionando las zonas de interés (Ilustración 16), con bisturí trocitos de aproximadamente $5mm^2$. Los trozos de material vegetal se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron con tampón cacodilato y se

conservaron en el frigorífico. Además, se postfijaron con OSO_4 (tetróxido de osmio) al 1% durante 2h a temperatura ambiente, se lavaron con tampón cacodilato y se conservaron en el frigorífico.

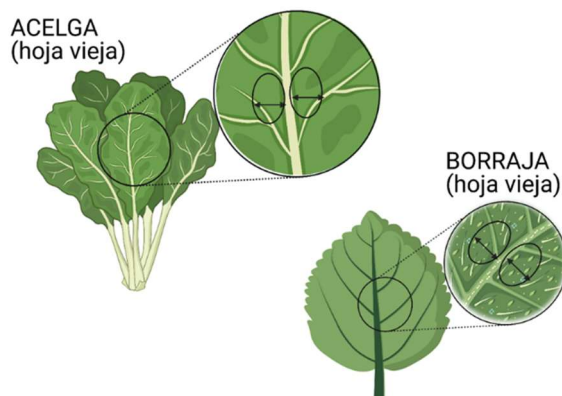


Ilustración 16. Zonas en las que se buscaron las bacterias *Methylobacterium Symbioticum*. Ilustración creada con BioRender.com.

Para obtener las muestras se sometió el material vegetal a los siguientes procesos:

1. Deshidratación: Se lavaron con agua y se deshidrataron con una serie de disoluciones acetona/etanol creciente en concentración de etanol 25%, 50%, 75%, 90% y 100%.
2. Secado en punto crítico de CO_2 : Se sometieron las muestras a un proceso de secado en punto crítico para eliminar el medio líquido en un equipo Baltec CPD 030.
3. Montaje: Se colocaron las muestras en un porta objetos metálico adheriéndolas al mismo con pintura de plata y orientándolas correctamente para observar las regiones de interés.
4. Metalización: Se recubrieron las muestras con una capa nanométrica de iridio en un equipo de electrodeposición catódica Cressington 208HR.

Una vez preparadas las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM 7200F, utilizando kilovoltajes entre 5 y 15kV.

3.5.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el programa “IBM SPSS statistics 27” para Windows. Para el análisis estadístico se realizó una comparación de medias T student y un análisis de varianza de una y dos vías.

- ***Comparación de medias T de Student para cada momento de crecimiento***

Se calculó la media como estadístico de tendencia central y el error estándar como estadístico de dispersión. Los cálculos estadísticos referidos a la comparación entre control y endófito fueron realizados bajo la asunción de que los datos seguían una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Este análisis se realizó mediante el test de comparación de medias t de Student. Todos los análisis estadísticos se realizaron a un nivel de significación de 5% ($P \leq 0,05$). El número máximo de observaciones es de 12 y el mínimo de 3.

- *Análisis de la varianza de dos y una vía*

Para las comparaciones estadísticas se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías y ANOVA simple. Primero se hizo un ANOVA simple en condiciones de bajo N para testar la eficiencia de la B-Alanina (mesa 1 vs 3: son los controles), y m2 vs 4 (endófito). Al no encontrarse diferencias significativas, los datos de mesa 1 y 3 se fusionaron y los de la 2 y 4 también. Tras lo cual se realizó un ANOVA de dos vías para testar las concentraciones N y el endófito y su posible interacción en los distintos parámetros analizados. Se asumió la igualdad de varianzas y distribución normal de los datos. (Anexo 1)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, tras la puesta a punto del sistema de cultivo NGS®, se van a incluir aspectos técnicos positivos y negativos de las mesas de hidroponía “Minicamp” que se han ido observando durante la fase experimental. Además, se van a mostrar las ventajas y desventajas del cultivo hidropónico NGS®. Por último, se van a mostrar todos los resultados obtenidos de la fase experimental, correspondiente a las soluciones nutritivas y parámetros fisiológicos y de crecimiento.

4.1 Aspectos técnicos positivos y negativos

4.1.1 Control de nutrientes

El cultivo con las mesas de hidroponía “Minicamp” nos ha permitido conocer y controlar qué nutriente y a qué concentración se le aportaba a cada tratamiento y qué cantidad era absorbida por el material vegetal. Permitiendo así determinar la eficacia real del bioestimulante. Esto en un cultivo convencional se habría complicado ya que es complejo determinar con exactitud qué nutrientes y en qué concentración se encuentran en el suelo, ya que algunos pueden no estar disponibles para las plantas y otros se pueden aportar a la planta por medio de interacciones con la rizosfera.

4.1.2 Control roedores

El día 49 del experimento, un conjunto de ratas se subió a 4 de las mesas de hidroponía y se comieron de modo selecta todos o la mayor parte de los brotes de las espinacas (Ilustración 17). Para evitar la reincidencia se compraron ese mismo día trampas de pegamento que se colocaron en las patas de las mesas y en otras superficies que les pudiera dar acceso al material vegetal. En los días siguientes, cayeron 4 ratones en las trampas y para evitar problemas futuros se dejaron colocadas las trampas hasta el final del experimento. Las espinacas terminaron su ciclo, pero los datos se descartaron ya que había mesas en las que todo el material vegetal de espinaca estaba dañado y los datos no iban a ser representativos.



Ilustración 17 .Incidencia ratas.

Al tratarse de un sistema que está colocado en mesas, no a nivel de suelo, nos permitió controlar la incidencia de los ratones de forma radical. Sin embargo, si el experimento se hubiera realizado mediante el sistema tradicional el problema se habría prolongado en el tiempo pudiendo llegar a comprometer el estudio.

4.1.3 Control frecuencia de riego

Con la frecuencia de riego se puede controlar que las necesidades hídricas estén en todo momento cubiertas de tal forma que la planta se desarrolle de forma óptima. Con estas mesas de hidroponía nos fue difícil llevarlo a cabo ya que se produjeron fugas a través de los extremos de los canales multibanda.

El día 60 del experimento, debido a que las plantas tenían un estado fenológico muy avanzado se decidió subir la frecuencia de riego aplicando un riego de 15 min cada media hora. Las fugas con una frecuencia de riego baja no provocaron apenas efectos negativos, en ocasiones era necesario cambiar la solución nutritiva antes de lo necesario, pero no se dañaba el material vegetal. Al aumentar la frecuencia de riego estas fugas si ocasionaron grandes daños ya que las cestas se quedaron vacías. Como resultado, las plantas estuvieron sin riego durante dos días (fin de semana) y las plantas presentaron un grado de marchitez severo (Ilustración 18). Tras el incidente se cambió la solución nutritiva, se dejó circulando durante media hora y se redujo la frecuencia de riego cada dos horas (frecuencia soportada por las mesas). No se perdió el material vegetal ya que las plantas se recuperaron del incidente en tres días (Ilustración 19). Debido a su estado se decidió retrasar la cosecha una semana más para que las plantas se recuperaran en su totalidad.



Ilustración 18. Marchitamiento del material vegetal



Ilustración 19. Estado tras el marchitamiento

4.2 Ventajas y desventajas del cultivo hidropónico NGS®

4.2.1 Ventajas

El sistema NGS® ofrece una cuantía de ventajas que se pueden resumir en: Calidad, precocidad, rendimiento y respeto del medio ambiente. En más detalle las ventajas son:

- a) Es un sistema versátil que permite la producción agrícola en condiciones medioambientales limitantes principalmente de agua, suelo y condiciones climáticas adversas. En el sistema hidropónico puro se trabaja con soluciones nutritivas por lo que el suelo no es imprescindible y se permite cultivar en suelos poco productivos o muy erosionados.
- b) Mejor aprovechamiento del agua ya que es un sistema cerrado donde por medio de drenajes el agua recircula. Esto evita que las soluciones nutritivas desemboquen en las masas de agua y así eludir la contaminación de suelos y acuíferos.
- c) Se obtiene una óptima relación aire/agua en el sistema radicular de la planta debido al riego continuo, favoreciendo a un óptimo desarrollo del cultivo.
- d) La nutrición está mucho más controlada que en los sistemas de cultivo en suelo, puesto que no existen interacciones entre la rizosfera del suelo. Se emplea una solución nutritiva con actividad microbiológica reducida.
- e) Se puede controlar muchos factores que influyen en el desarrollo de los cultivos a tal grado de poder modificar la concentración de nutrientes y las dosis de riego según el estado fenológico en el cual se encuentre el cultivo. Incluso, se puede combinar con estructuras de protección que permiten tener un mayor control sobre el cultivo en cuanto a las condiciones climáticas adversas, la incidencia de plagas y enfermedades. Por consiguiente, permite reducir el uso de tratamientos fitosanitarios y obtener productos de mayor calidad que en sistemas convencionales.
- f) Se suprimen los trabajos de preparación de suelo, abonados de fondo y eliminación de malas hierbas. Además, permite la inspección rápida de las raíces, el proceso de producción es más limpio y el cambio de cultivo es más rápido y limpio.

- g) El control de la salinidad de la zona radicular es mucho más fácil en los sistemas sin suelo, lo que posibilita el uso de aguas de baja calidad con aceptables resultados productivos. En el suelo la salinización es más lenta pero acumulativa, lo que a medio plazo se ocasionan serios problemas que su solución es compleja.
- h) La densidad de población vegetal deja de ser tan determinante en comparación con un sistema tradicional ya que se proporciona las condiciones ideales de riego y nutrición para un crecimiento óptimo de cada planta. Por esta razón, las plantas sufren menos estrés por competencia y hay una mayor densidad de plantación en hidropónico que en sistemas con suelo.

4.2.2 Desventajas

A continuación, se van a describir los inconvenientes principales del sistema hidropónico NGS®:

- a) El suelo tiene un papel fundamental como amortiguador de tal forma que las plantas cultivadas en suelo tienen una mayor capacidad de tolerar los cambios bruscos. A diferencia de esto, en hidropónico un cambio de temperatura, pH, conductividad eléctrica o concentración de nutrientes puede provocar daños sobre el cultivo.
- b) La hidroponía no es apta para todas las especies de plantas, como por ejemplo los árboles frutales o los tubérculos.
- c) Requiere un control riguroso y severo en cuanto a riego. Éste debe estar constantemente controlado y debe ser periódico.
- d) En los sistemas de hidroponía pura el estado de la rizosfera es más favorable para la raíz, pero también lo es para sus patógenos. Esto supone que cuando un inóculo penetra en el cultivo, su propagación se ve favorecida por el medio acuoso e incidencia es mayor que en un cultivo con suelo.
- e) La implantación de sistemas de hidroponía requiere una elevada inversión inicial, tanto por los elementos de riego, por adecuar el cabezal de riego y la adquisición de contenedores. Esto implica a su vez, tener un control riguroso y exhaustivo de la instalación. Un fallo en el sistema puede comprometer la producción, sin embargo, en sistemas de suelos los fallos se toleran mejor.
- f) Al tratarse de un sistema innovador el agricultor requiere asesoramiento técnico para hacer un uso eficiente de la instalación.

4.3 **Parámetros soluciones nutritivas**

Los parámetros que se han tenido en cuenta para las soluciones nutritivas son las concentraciones de los cationes y aniones y el pH durante el ciclo del cultivo. Para ello, se han analizado las muestras que se cogieron de entrada y de salida de cada uno de los cambios de disolución. Como tiempo 0 se ha establecido el primer cambio de disolución que se realizó, únicamente se usó la solución nutritiva 1 hasta el día 25 que es cuando se empleó las soluciones nutritivas 1 y 2. Por ello, se ha empezado a representar los aniones y cationes desde el día 25. Los pH se han representado desde el primer cambio de disolución (tiempo 0).

4.3.1 Cationes

Los cationes que se han analizado en las soluciones nutritivas son ion amonio (NH_4^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). El ion amonio en los tratamientos que contenían la solución 2 (Figura 1A y 1B) prácticamente desde el principio de la primera fase de crecimiento del cultivo los recursos se agotaban para cada cambio de disolución. Sin embargo, en la Figura 1C, alto N, los recursos se empezaron a agotar cuando las plantas tenían gran desarrollo vegetativo (escala BBCH 42 en el día 55). Los iones potasio prácticamente no se agotaban, únicamente en el tratamiento de alto N (Figura 1F) cuando las plantas estaban alcanzando el tamaño comercial (escala BBCH 42 en el día 55). A su vez, en los tratamientos de bajo N (Figura 1D y 1E) las necesidades permanecieron prácticamente constantes a lo largo de todo el periodo. Los iones magnesio y calcio no se llegaron a agotar en ninguno de los tratamientos, es más, la concentración de los iones absorbidos por la planta ronda los mismos valores a lo largo del ciclo del cultivo. Es destacable que los iones magnesio y calcio en el día 55 sufren alguna anomalía ya que la concentración de entrada es muy elevada y la absorbida por las plantas también, cosa que no es coherente ya que en los siguientes días no se sigue la misma tendencia. Esto puede deberse a que no se esperó el tiempo suficiente a que la solución nutritiva se homogeneizara con el agua desionizada y se cogió una muestra heterogénea.

4.3.2 Aniones

Los aniones que se han analizado en las soluciones nutritivas son ion nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}) y fosfato (PO_4^{3-}). Al igual que el amonio, el nitrato en la Figura 2A y 2B se agota prácticamente desde el principio del ciclo. En la Figura 2C, se comienzan a agotar los recursos al final del experimento donde las necesidades por parte del material vegetal son mayores. Los iones sulfato y fosfato no se agotan en ningún punto del ciclo. En la Figura 2D y 2E se observa que las necesidades del material vegetal de ambos tratamientos son iguales con alguna pequeña variación. Además, estas necesidades son parecidas a las de la Figura 4F donde las plantas tienen un desarrollo vegetativo considerablemente mayor. La Figura 2G y 2H presentan varios puntos incoherentes y puede deberse a un problema en el etiquetado, a su vez, se aprecia que las plantas de la Figura 2G han absorbido menor cantidad de fosfato que las de la Figura 2H. En la Figura 2I, tratamiento de alto N, a partir del día 55 las absorciones se triplican continua la tendencia hasta el día de la recolección. Al igual que en los cationes, en el día 55 presenta un pico muy superior al resto de concentraciones de entrada lo que nos sugiere que hubo una anomalía en la cogida de datos o hubo un problema en la adición de las soluciones nutritivas.

4.3.3 Ph

En la Figura 3 están representados los pH de entrada y de salida de las soluciones nutritivas 1 y 2 a lo largo de todo el experimento. En la Figura 3A y 3B se observa que hay un cambio de tendencia en el día 27, se pasa de un pH entorno al 5,5 a uno entorno al 7. Esto se debe a que hasta el día 27 todos los tratamientos contenían la solución nutritiva 1, a partir de ese día, a los tratamientos de la Figura 3A y 3B se pasó de incorporar la solución 1 a incorporar la solución nutritiva 2 lo que provocó la subida de pH. Los pH superiores a 6,5 dificultan la absorción de ciertos compuestos y a su vez favorecen su precipitación. Por ello y porque nuestro objetivo era que todos los tratamientos estuvieran bajo los mismos parámetros, a partir del día 34 en cada cambio de solución se añadió ácido sulfúrico (H_2SO_4) para reducir el pH en torno a 6. En la Figura 3C, durante todo el espacio temporal contiene la misma solución nutritiva, donde se observa que las entradas tienen pH más ácido que los de salida y la tendencia se va agravando conforme las plantas adquieren un mayor desarrollo fenológico.

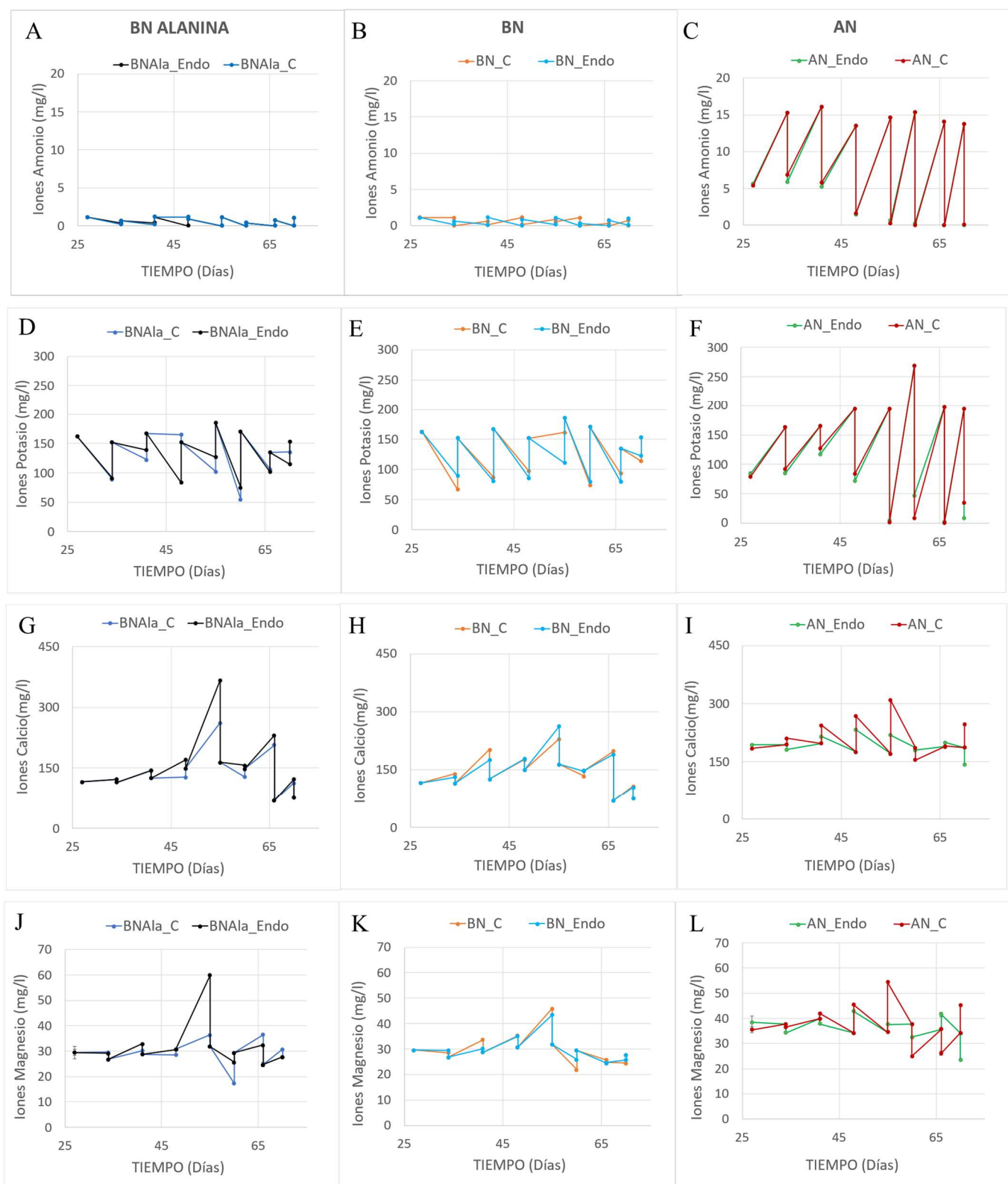


Figura 1. Evolución de la concentración de los cationes; amonio, potasio, calcio y magnesio para los diferentes tratamientos de bajo nitrógeno con β -alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN).

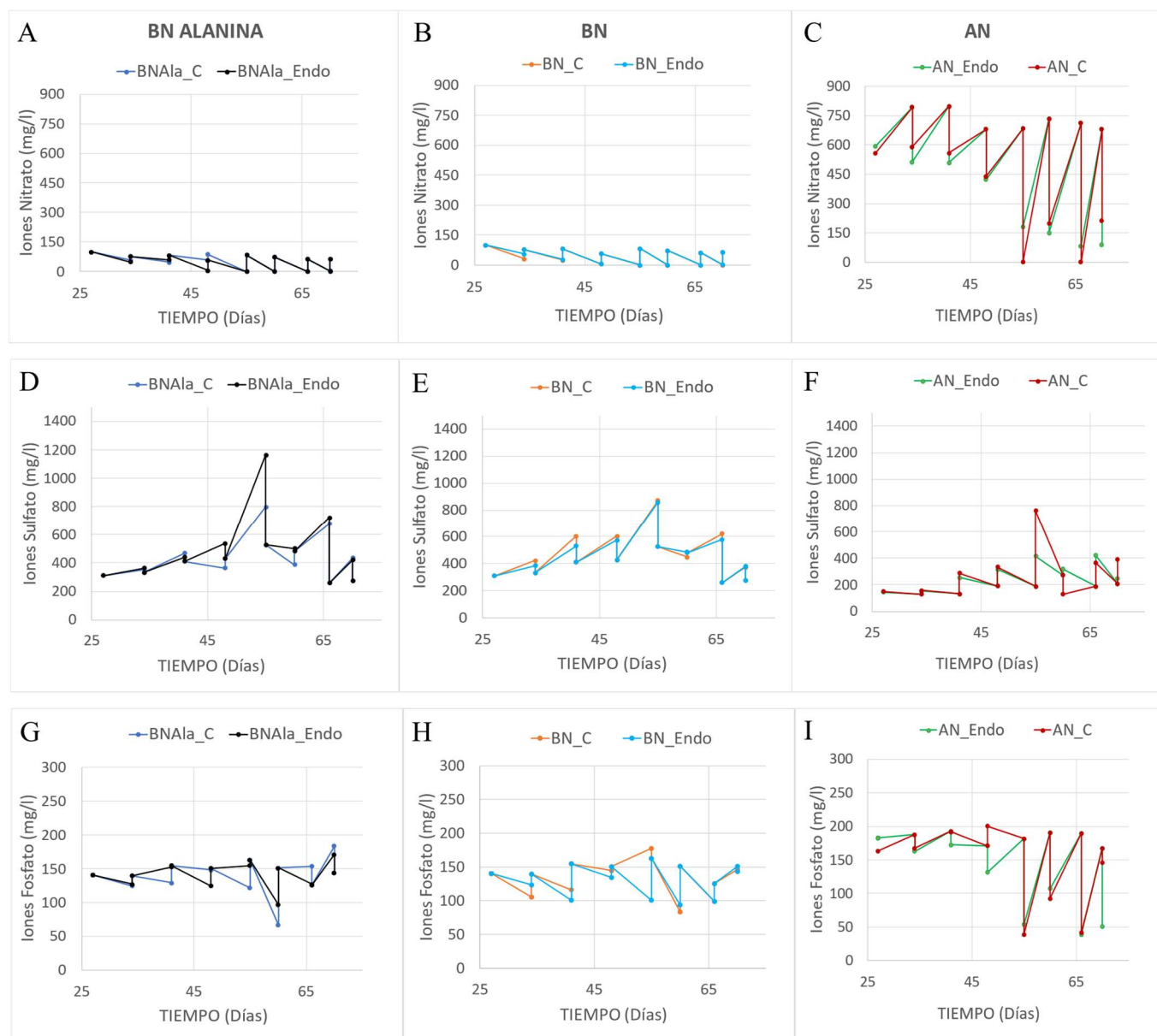


Figura 2. Evolución de la concentración de los aniones; nitrato, sulfato y fosfato para los diferentes tratamientos de bajo nitrógeno con β -alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN).

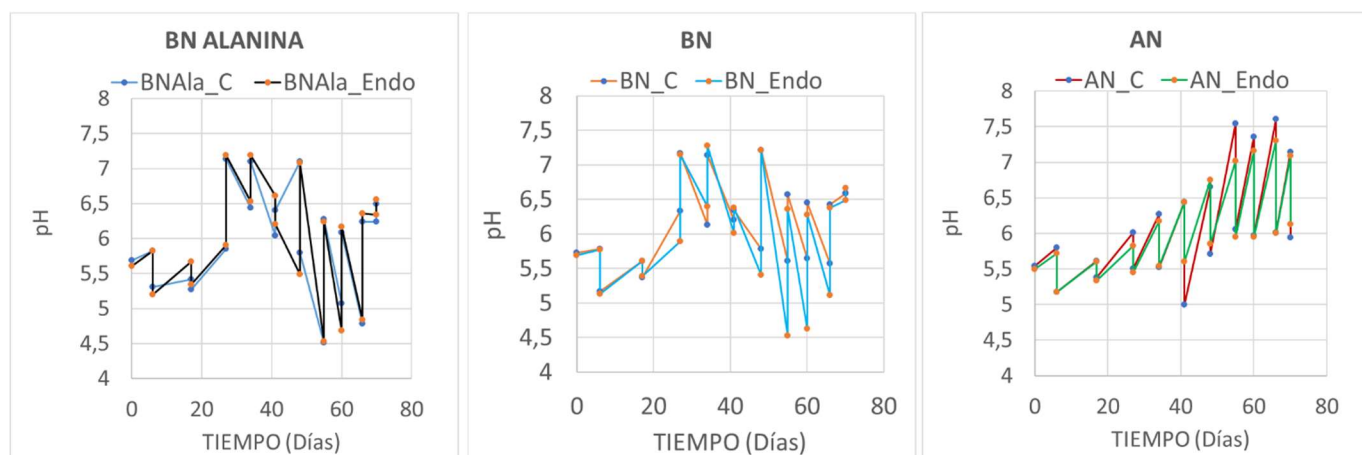


Figura 3 Evolución del pH de las soluciones nutritivas 1 y 2 para los diferentes tratamientos de bajo nitrógeno con β -alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN)

4.4 Parámetros crecimiento

Para determinar los parámetros de crecimiento se ha tenido en cuenta la evolución de los pesos de los diferentes órganos (parte aérea y radicular), el peso total de la planta y la ratio raíz/parte aérea de cada una de las especies. El ratio raíz/parte aérea nos indica la distribución de la biomasa de la planta. De cara al valor del producto, nos interesa que sea lo más pequeño posible (si lo comercializable es la parte aérea) sin que comprometa el desarrollo del cultivo. Un alto ratio raíz/parte aérea, significa que la planta está dirigiendo sus recursos (fundamentalmente carbono) a la raíz y por tanto estamos “perdiendo” dinero, ya que lo que vendemos en este caso es la parte aérea.

Como tiempo 0 se ha establecido el día en el que se realizó el tratamiento con BlueN® debido a que hasta ese momento todo el material vegetal tenía unas condiciones similares.

4.4.1 Borraja

En las figuras correspondientes a los tratamientos de bajo N con β - alanina (Figura 4A,4D,4G,4J) el endófito presenta algún punto con diferencias significativas frente al control. Únicamente se aprecia en la Figura 4G y 4J donde se representa el peso total de la planta y el ratio entre la raíz y la parte aérea a lo largo del tiempo. De los 6 puntos de muestreo en la Figura 4G solo dos de ellos son significativos, correspondiendo a los tiempos 14 y 34. En la Figura 4J únicamente es significativo el día 14. Dado la escasez de puntos donde el endófito produce una mayor biomasa sobre el control no se puede determinar que produzca ningún efecto positivo.

En las figuras correspondientes a los tratamientos de bajo N únicamente hay un punto significativo a favor del endófito en la Figura 4B en el día 34 donde está representado el peso fresco de la parte aérea respecto al tiempo. En los parámetros de crecimiento establecidos en el tratamiento de alto N (Figura 4C,4F,4I,4L) no se ve que haya ninguna diferencia significativa entre control y endófito.

Podemos determinar que el endófito en borraja no ha sido efectivo, por lo cual no cumple con el objetivo, ya que a pesar de no haber diferencias significativas claras tampoco se observa que la tendencia sea a generar un mayor desarrollo vegetativo en comparación con el control en ninguno de los tratamientos.

4.4.2 Acelga

En las figuras correspondientes a los tratamientos de bajo N con β - alanina (Figura 5A,5D,5G,5J) sí se presentan diferencias significativas. Estas diferencias son a favor del endófito únicamente en la Figura 5D que representa el peso fresco en gramos de la parte radicular a lo largo del tiempo. A su vez, cuanto más se avanza en el tiempo más pronunciadas son estas diferencias. Esto sugiere que el endófito favorece a un mayor desarrollo de la raíz en acelga.

En las figuras correspondientes a los tratamientos de bajo N únicamente es mayor el endófito frente al control en la Figura 5K donde se representa el ratio entre la raíz y la parte aérea. En los parámetros de crecimiento establecidos en el tratamiento de alto N (Figura 5C,5F,5I,5L) no se ve que el endófito tenga ninguna diferencia significativa.

Con todo, podemos determinar que el endófito en acelga no ha cumplido con el objetivo establecido ya que no se ha conseguido que el endófito sea capaz de transferir N a la planta en cantidades suficientes como para igualar o asimilar su desarrollo a concentraciones de alto N. Únicamente podemos decir que el bioestimulante tiende a estimular a la planta para que tenga un mayor desarrollo radicular, característica no deseada. Esto no cumple con el objetivo ya que en

ningún caso se podría reducir la aplicación de N mineral para sustituirlo por la aplicación del endófito sin disminuir drásticamente la producción.

No obstante, existen estudios relacionados con los bioestimulantes nitrogenados que han mostrado efectos más efectivos que el del presente estudio. Por ejemplo, los inoculantes a base de dos cepas de *Trichoderma* (*T.virens* GV41 o *T.harzianum* T22) se han empleado en dos especies de hortalizas; lechuga y rúcula (Fiorentino et al., 2018). En este estudio, se ha demostrado que la aplicación de estas cepas bacterianas aumentan significativamente la eficiencia en el uso del N en lechuga en todas las condiciones de fertilización (subóptimas, óptimas y supraóptimas de fertilización de N). Sobre todo, la cepa *Trichoderma cepa* GV4 mostró buen rendimiento tanto en baja fertilización como en óptima y sobre todo favorece la absorción de N originario del suelo. La rúcula no presentó unos rendimientos tan buenos, lo que nos indica que esta bioestimulante no es global si no que depende de la familia botánica del cultivo. Otro estudio realizado por Assainar et al. (2018) en un suelo moderadamente deficiente en N y P al sureste de Australia, mostró que el uso de un inoculante microbiano formado por múltiples especies microbianas estimuló el rendimiento del grano de trigo al mismo nivel que el tratamiento con los fertilizantes aplicados al suelo.

Por otra parte, en la última década se ha investigado sobre los hidrolizados de origen vegetal (PH) ya que mejoran el rendimiento, la calidad nutricional y la tolerancia a los estrés abióticos. Por ello Sestili et al. (2018) realizó un estudio para determinar los efectos de un PH derivado de leguminosas en concentraciones óptimas y subóptimas de N en tomate mediante aplicación foliar y empapamiento del sustrato. Los resultados de peso seco de la raíz y la planta total, el índice de SPAD y el contenido de N en la hoja fueron mayores en los tratamientos de empapamiento en comparación con las plantas no tratadas. A su vez el tratamiento foliar dio unos valores intermedios en comparación con las plántulas no tratadas.

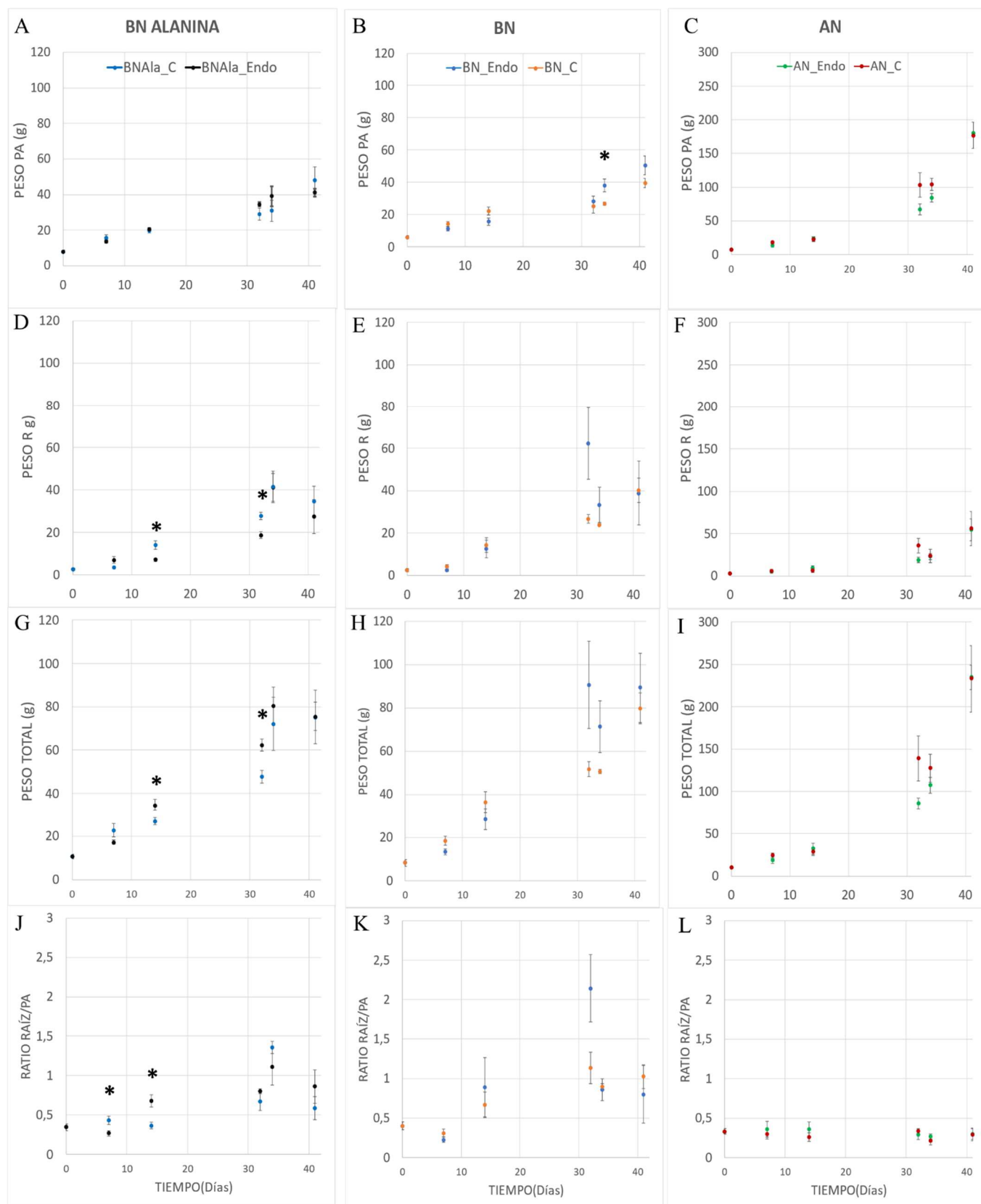


Figura 4 Parámetros crecimiento borraja. Efecto del endófito sobre los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β -alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN). Los valores representan el promedio \pm el error estándar ($n=4-5$). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada tiempo (días) entre el control y el endófito.

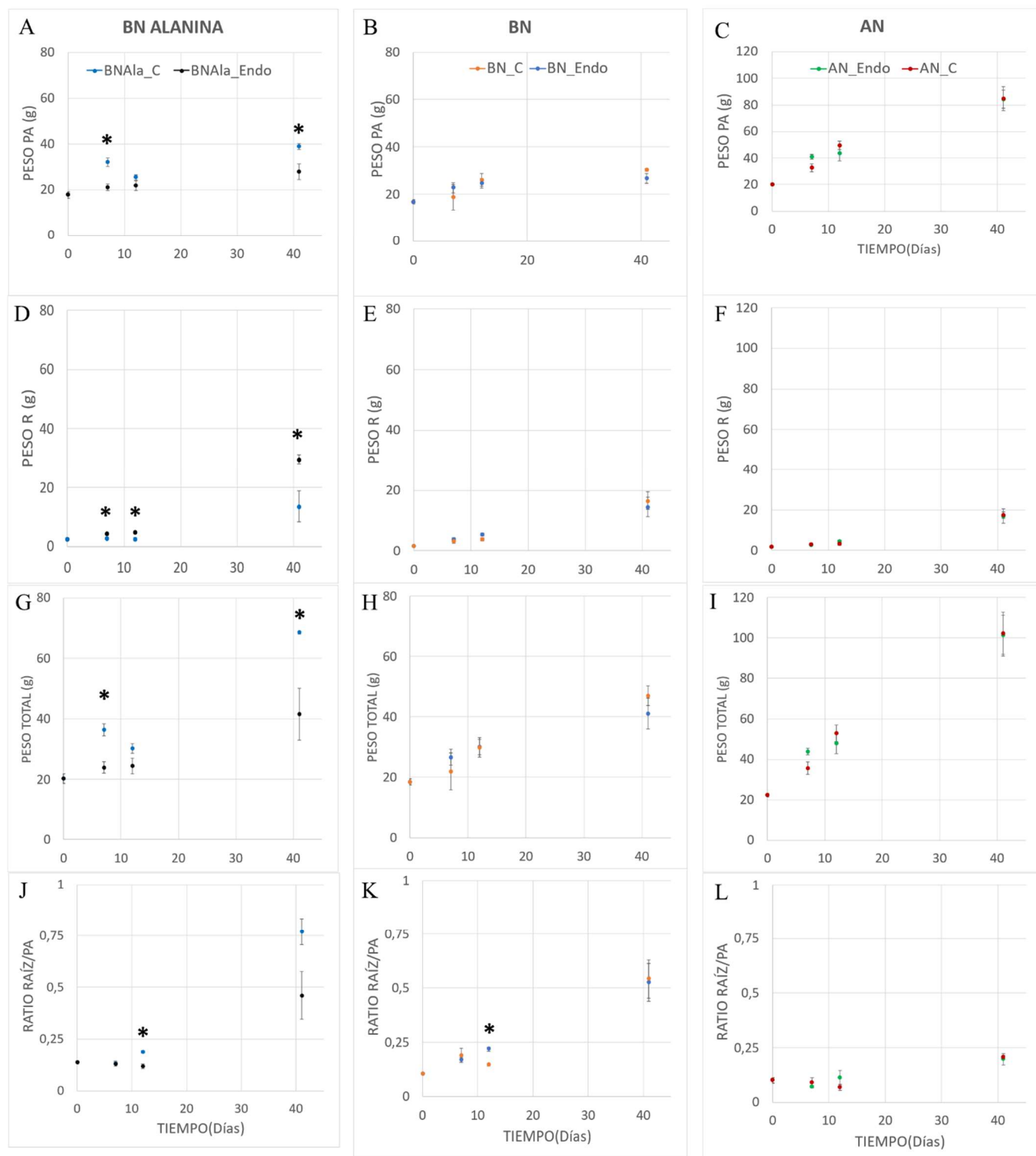


Figura 5. Parámetros de crecimiento acelga. Efecto del endófito sobre los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de acelga crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β -alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN). Los valores representan el promedio \pm el error estándar ($n=3-4$). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada tiempo (días) entre el control y el endófito.

4.5 Parámetros fisiológicos

Para determinar los parámetros fisiológicos se han realizado mediciones de SPAD, conductancia estomática, SLA, área total foliar para las especies de borraja y acelga. **Como tiempo 0 se ha establecido el día que se realizó el tratamiento con BlueN® ya que hasta ese día las condiciones de crecimiento eran iguales para todo el material vegetal.**

4.5.1 Borraja

La medición SPAD determina la cantidad de clorofila presente en la hoja. La clorofila está relacionada con el estado nutricional de las plantas, a mayor clorofila mayor contenido de N está presente en la planta.

En la Figura 6, están representados los valores de SPAD para cada uno de los tratamientos durante toda la fase del cultivo. En la Figura 6A (control + β -alanina frente a endófito + β -alanina), se observa que entorno al día 20 hay varios puntos donde el SPAD del endófito es mayor, de forma significativa, frente al control. En la Figura 6B, los valores del control y del endófito son parecidos, algún pico en los valores del control, hasta el día 30 donde el SPAD del control baja hasta 31-32 u.a y el endófito sube hasta 40-41 u.a obteniendo diferencias significativas. En la Figura 6C, se puede comprobar que los valores de SPAD del endófito a lo largo de todo el periodo temporal son superiores a los del control obteniendo varios puntos (27- 40) donde las diferencias son significativas. Esto se puede deber a que las plantas se encontraban en un estado fenológico muy avanzado donde las necesidades de N eran mayores que las que se le aportaba (Figura 3C).

A su vez, cabe destacar que los valores del control y del endófito en de la Figura 6A y 6B se sitúan en el mismo rango, sin embargo, los de la Figura 6C contienen valores inferiores. Como se ha mencionado anteriormente, el SPAD mide la cantidad de clorofila en la planta lo que se puede relacionar de forma directa con el estado nutricional de la planta. Por tanto, el obtener unos valores tan bajos de SPAD en la Figura 6C, cuya solución nutritiva era la 1, fue debido a que la planta carecía de algún elemento en la solución nutritiva que con el paso de los días se fue manifestando de forma significativa en la apariencia física de la planta. En la Ilustración 20 se puede ver que esta carencia, expresada en clorosis internerval, fue manifestada en algunas de las plantas de borraja no de forma generalizada. Esto pudo deberse a que no todas tenían el mismo desarrollo radicular por lo cual algunas estaban en ventaja frente a otras y no manifestaron la carencia. Además, en la Ilustración 21 se puede observar que el elemento carente no se transloca a las partes vegetales jóvenes ya que las hojas más viejas están de color verde intenso y las jóvenes estas amarillas, esto es indicativo de que es un elemento poco móvil. A su vez, se observa que la zona amarilleada corresponde con el limbo de la hoja y el haz vascular permanece verde (Clorosis internerval). Se sabía que el N no podía ser ya que en la solución nutritiva se encontraba en exceso (Figura 3C) y los otros tratamientos que apenas contenían N no manifestaban esta carencia. Además, el N es un elemento móvil que cuando hay deficiencia se mueve rápidamente de las hojas viejas a las jóvenes, se pudo observar en los tratamientos con bajo N (Ilustración 22). Se comparó la composición de la solución nutritiva y se concluyó que el elemento carente podía ser el Azufre (S), de tal forma que se añadió 30 ml de K_2SO_4 0,6 mM. Esto se realizó el día 12, como se observa en la Figura 6C a partir de ese punto los valores de SPAD aumentan hasta alcanzar valores similares a los del resto de tratamientos.



Ilustración 20. Carencia de elemento en tratamientos



Ilustración 22. Inmovilización elemento carente en tratamiento de alto N



Ilustración 21. Movilización elemento carente en tratamiento de bajo N

En la Figura 7A, está representada la conductancia estomática en el día 75 del experimento. De los resultados obtenidos únicamente es significativo el tratamiento con bajo N donde el endófito presentaba un mayor índice, casi el doble, de apertura de estomas que el control. En los otros dos tratamientos el endófito y el control presentan índices de apertura de los estomas similares. En la Figura 7B, está representado el SLA que permite determinar el grosor de las hojas de las plantas. A mayor SLA menor es el grosor de la hoja. En los resultados, no se han encontrado diferencias significativas entre el control y el endófito en ninguno de los tratamientos nitrogenados. Sin embargo, se percibe que las borrajas del tratamiento de alto N son la mitad de finas que las de los tratamientos de bajo N y bajo N con β -alanina. Por último, en la Figura 7C, está representado el área total foliar. Tampoco se han obtenido diferencias significativas entre el endófito y el control, no obstante, se puede ver que el área foliar de las borrajas pertenecientes al tratamiento de alto N es tres veces mayor que las del resto de tratamientos.

En la Figura 10 está representado el %N en la parte aérea y radicular de las plantas de borraja. No hay diferencias significativas entre el control y el endófito, sin embargo, como cabe esperar hay mayor cantidad (más del doble) de N en las plantas crecidas condiciones de alto N.

4.5.2 Acelga

En la Figura 8, apenas se ve que el endófito tenga ningún efecto significativo. En la Figura 8A, se observa que únicamente en el día 30 el valor del SPAD del endófito presenta diferencias significativas frente al control. En la Figura 8B ambos tratamientos llevan una tendencia parecida y en un punto (día 7) hay diferencias significativas a favor del control. Por último, en la Figura 8C, en el día 0 hay diferencias significativas a favor del endófito, sin embargo, no puede deberse a su efecto ya que su aplicación se realizó ese mismo día y en principio sus efectos no se comienzan a ver hasta 7 días después. Cabe destacar que en la Figura 8A y 8B correspondientes a los tratamientos de bajo N con β - alanina y bajo N la tendencia de los valores es descendente a lo largo de espacio temporal llegando a alcanzar valores de 20-25 u.a.

La acelga también manifestó de forma visible carencias de elementos en el tratamiento de alto N (Figura 8C). A su vez se observa que a partir del día 14 el SPAD aumenta de forma significativa de tal forma que posiblemente la acelga también estuviera sufriendo la escasez de Azufre. (Ilustración 23)



Ilustración 23. Escasez de elementos en acelga

En los resultados de conductancia estomática (Figura 9A) se aprecia que en el tratamiento de alto N la apertura de los estomas del control es el doble que la del endófito. En el resto de tratamientos apenas se aprecian diferencias, sin embargo, el control en todos los casos tiene una mayor apertura estomática que el endófito. En la Figura 9B, las plantas que mayor grosor presentan son las del tratamiento de bajo N, le siguen las del bajo N con β - alanina y por último las de alto N. En el tratamiento de bajo N con β - alanina el control presenta diferencias significativas frente al endófito, lo que nos sugiere que el endófito junto con la β - alanina contribuye a aumentar el grosor de la hoja, sin embargo, este efecto no se ve en borraja. Por último, en la Figura 9C, se aprecia que el área total foliar entre el control y el endófito de las acelgas del tratamiento de bajo N con β - alanina sí que presenta diferencias significativas a favor del control, es decir, el control tiene una mayor área total que la del endófito. Además, el área total foliar del tratamiento de alto N es tres veces mayor que la del resto de tratamientos.

En la Figura 11 está representado el %N en la parte aérea y radicular de las plantas de acelga. En el tratamiento de bajo N con alanina (Figura 11A) se puede observar que las plantas crecidas con el endófito han sido capaces de fijar en sus estructuras, de forma significativa, más N que las control. Al igual que en borraja, tanto en la parte aérea como en la radicular las plantas crecidas condiciones de alto N contienen más cantidad de N en sus estructuras, más del doble

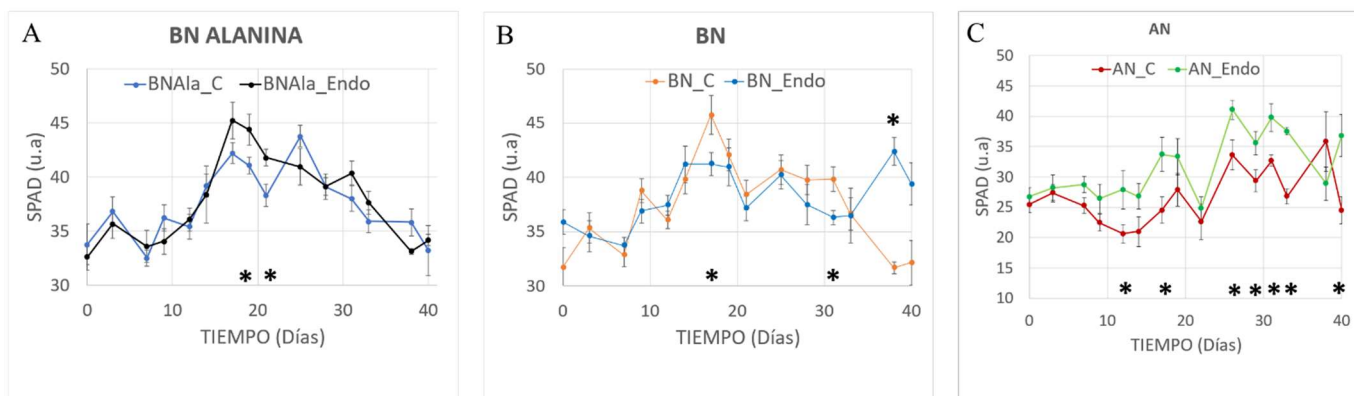


Figura 6. SPAD borraja. Efecto del SPAD (u. a) en función del tiempo (días) en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β - alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN). Los valores representan el promedio \pm el error estándar(n=11-5). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada tiempo (días) entre el control y el endófito.

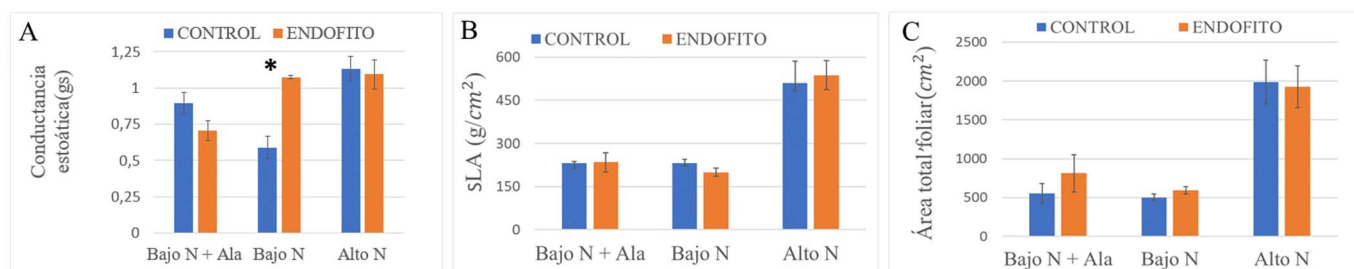


Figura 7 Conductancia estomática(A), SLA (specific leaf area) (B) y área total foliar (C) en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β - alanina (BN + Ala), bajo nitrógeno (Bajo N) y alto nitrógeno (Alto N). Los valores representan el promedio \pm el error estándar (A: n=5; B: n=3; C: n=3). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada condición entre el control y el endófito.

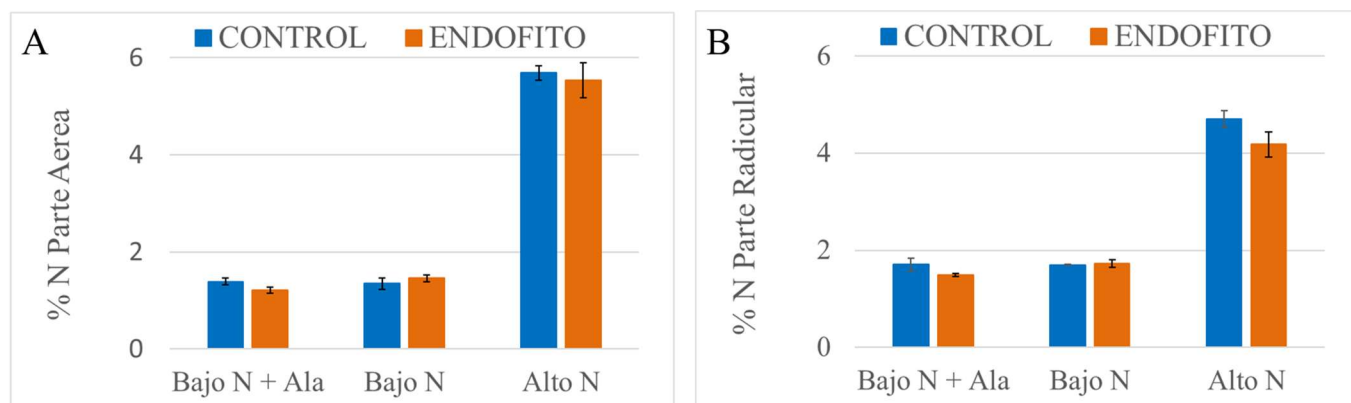


Figura 8. Porcentaje de N en (A) parte aérea y (B) parte radicular de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β - alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN). Los valores representan el promedio \pm el error estándar(n=3). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada tiempo (días) entre el control y el endófito.

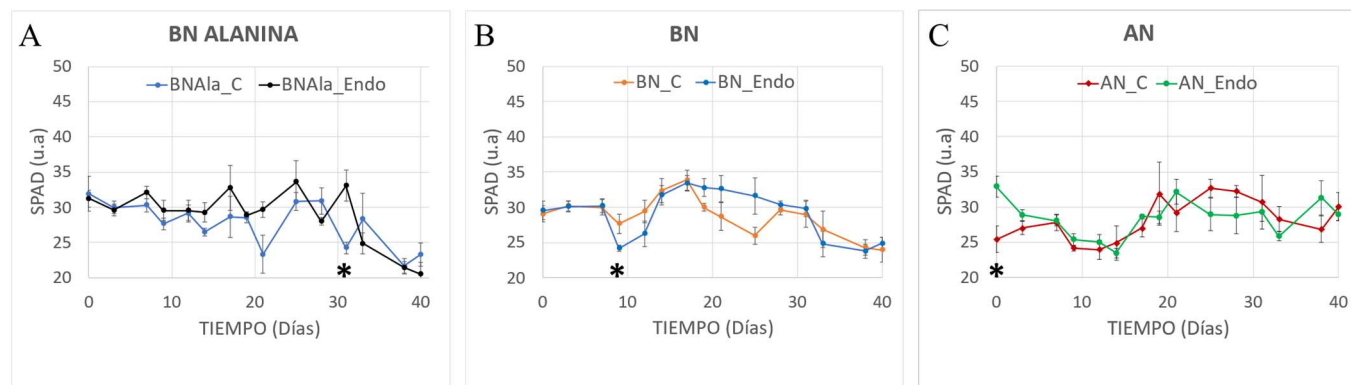


Figura 9 SPAD acelga. SPAD (u. a) en función del tiempo (días) en plantas de acelga crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β - alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN). Los valores representan el promedio \pm el error estándar (n=11-3). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada tiempo (días) entre el control y el endófito.

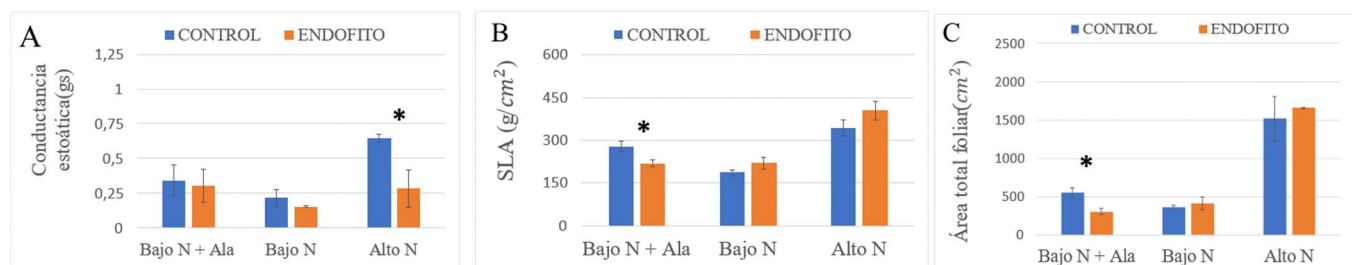


Figura 10. Conductancia estomática(A), SLA (specific leaf area) (B) y área total foliar (C) en plantas de acelga crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β - alanina (BN + Ala), bajo nitrógeno (Bajo N) y alto nitrógeno (Alto N).). Los valores representan el promedio \pm el error estándar (A: n=5; B: n=3-4 n=3-4). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada condición entre el control y el endófito.

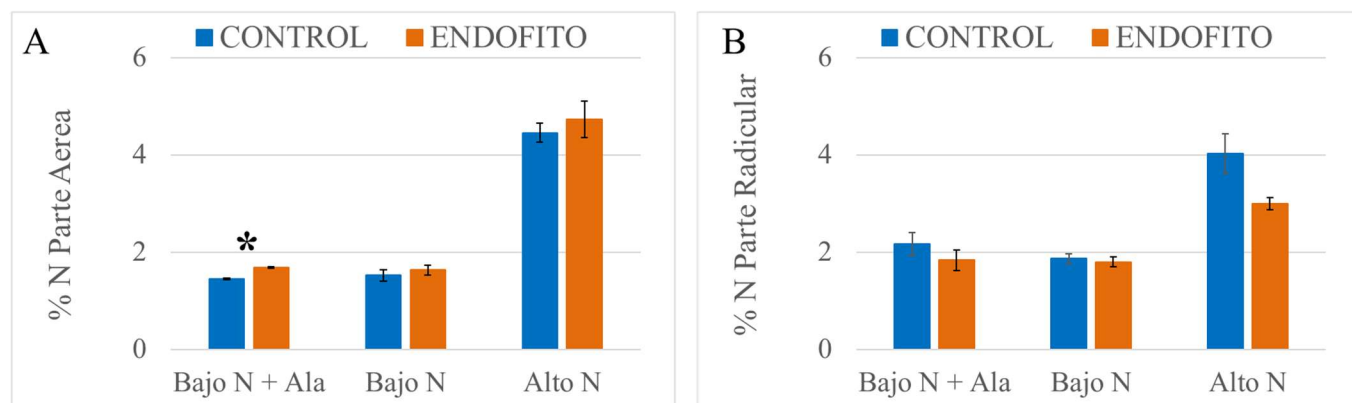


Figura 11 Porcentaje de N en (A) parte aérea y (B) parte radicular de acelga crecidas en condiciones de bajo nitrógeno con β - alanina (BN Alanina), bajo nitrógeno (BN) y alto nitrógeno (AN). Los valores representan el promedio \pm el error estándar(n=3-4). El asterisco (*) indica las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para cada tiempo (días) entre el control y el endófito

4.6 Colonización endófitra

4.6.1 Estado vida libre

En la Ilustración 24 se aprecian las bacterias *M. symbioticum* en vida libre (aspecto visual en cultivo líquido y en placa de agar y micrografía tomada por SEM, SAI Microscopía Galicia). El estudio de (Pascual et al., 2020) indica que las bacterias *M. symbioticum* son bacilos formadores de colonias con un aspecto rosa intenso brillante. En la Ilustración 24 se observa que nuestros resultados coinciden con los del estudio.

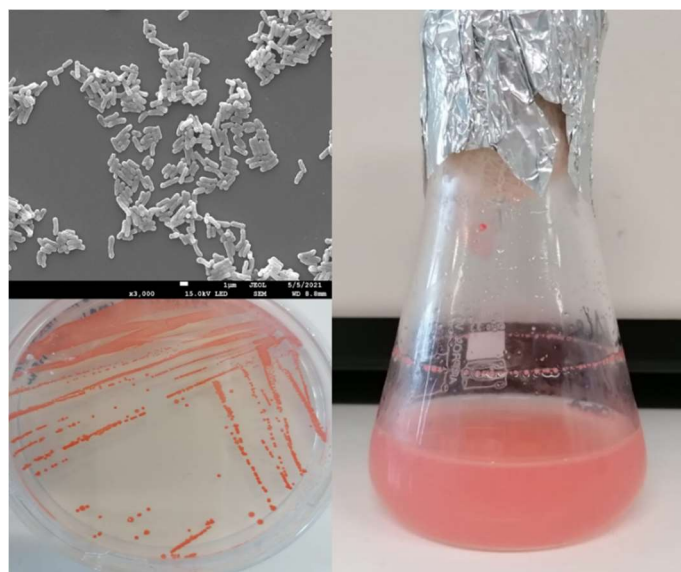


Ilustración 24. *M. symbioticum* en placa de agar, cultivo líquido y micrografía SEM en vida libre.

4.6.2 Colonización en borraja

En la Ilustración 25 se observa que en una hoja de borraja convive una colonia de bacterias cuya forma es cocos. Se sabe que nuestras bacterias tienen forma de bacilos (Ilustración 24) por lo cual se descarta que corresponda con nuestra bacteria *M. symbioticum*. Además, se llevaron a analizar hojas de borraja tanto de las hojas que habían sido colonizadas como en el control. Aparentemente las bacterias de la Ilustración 25 también estaban presentes en las muestras de del material vegetal control lo que es indicativo que las muestras se contaminaron en el proceso de fijación de la muestra o que en el invernadero estaban presentes estas bacterias que colonizan las plantas.

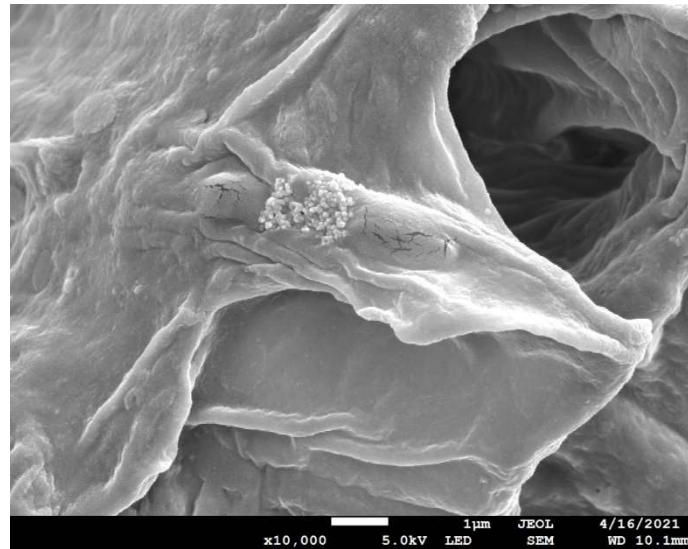


Ilustración 25. Colonia bacteriana en borraja

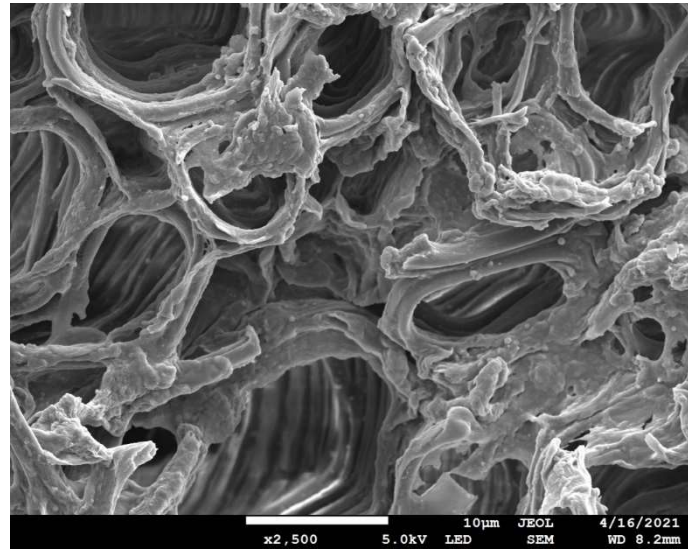


Ilustración 26. Haces vasculares y bacterias en borraja

En la Ilustración 26 se pueden observar los haces vasculares de una hoja de borraja junto con microorganismo que podrían asemejarse a bacterias con forma de cocos. Nuevamente se puede decir que las bacterias que se visualizan no corresponden con las bacterias de interés.

Desde el punto de vista fisiológico las plantas necesitan los tejidos conductores para su crecimiento ya que es por donde se transporta y distribuye por toda la planta el agua y las sustancias orgánicas. Pero otra de sus funciones es la de soporte a modo de esqueleto tanto en la parte aérea como en la radicular. Además, permite la comunicación entre las diferentes partes de la planta ya que es el medio por donde se distribuyen las señales como las hormonas. Durante el crecimiento primario las plantas originan el protoxilema y protofloema a partir del procambium. El xilema y el floema están próximos a los órganos de la planta debido a que proceden de las mismas células meristemáticas. (Megías et al., 2014)

En la Ilustración 24 parece que los vasos conductores pertenecen al xilema, haz vascular encargado de transportar y repartir agua y sales minerales de la raíz al resto de la planta, de la borraja esto se debe a que se diferencian los elementos traqueales que son células con una pared secundaria dura, gruesa y lignificada. Las formas de los engrosamientos de las paredes secundarias pueden ser muy variables en este caso tiene forma helicoidal. Aparte de las traqueidas

del xilema está formado por otros tres tipos celulares: células parenquimáticas (su función principal es la comunicación o almacenamiento), traqueidas (constituyen las células conductoras) y las células de sostén (fibras de esclerenquima y esclereidas). El xilema es el haz vascular encargado de transportar y repartir agua y sales minerales de la raíz al resto de la planta.(Megías et al., 2014)

4.6.3 Colonización en acelga

En la Ilustración 27 se puede observar varias colonias de bacterias en hojas de acelga tratada, sin embargo, ninguna se asemeja con las de la Ilustración 24. Además, para realizar las micrografías con SEM se examinó tanto material colonizado como material control y en ambos se observaron microorganismos similares. En los fragmentos de hoja control también se observaban estas bacterias por lo cual se descarta la posibilidad de que se trate de la bacteria aplicada. Esto nos indica que no son *M. symbioticum* y puede tratarse de otras bacterias que viven en el interior de la planta o que se haya producido una contaminación en el manejo de las muestras. Cabe destacar, que la búsqueda de estas bacterias en la hoja fue árida y compleja. Consideramos que si la bacteria hubiera colonizado de forma satisfactoria su búsqueda habría sido más sencilla ya que habría numerosas colonias (colonización masiva).

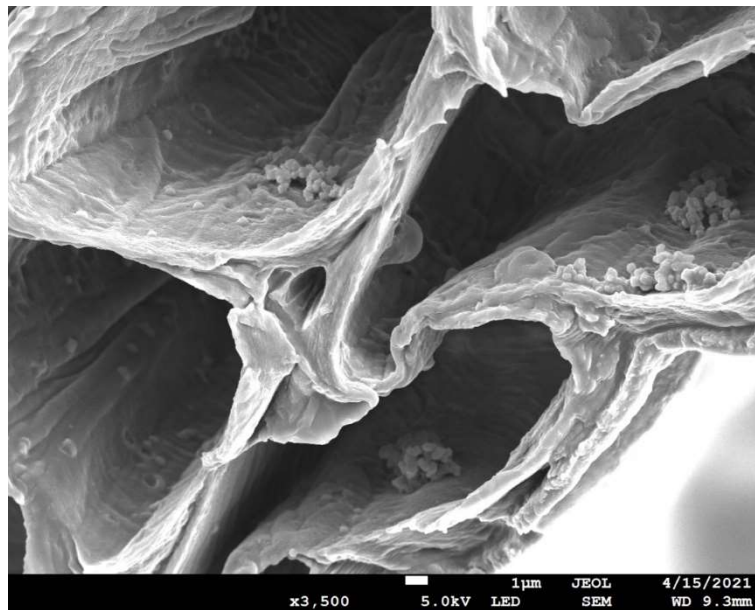
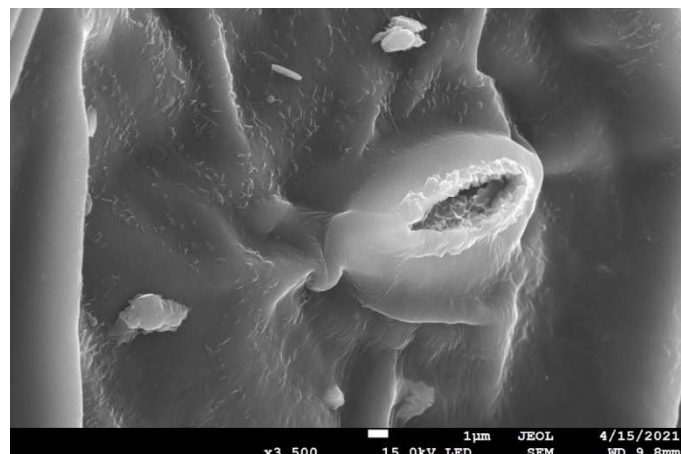


Ilustración 27 haces vasculares con colonias de bacterias en acelga



En la Ilustración 28 se aprecia un estoma abierto sobre la superficie de una hoja de acelga. Los estomas son estructuras que se encargan del intercambio gaseoso de hídrico con la atmósfera. Suelen aparecer sobre todo sobre el envés de la hoja, la no expuesta al sol. El número de estomas varía por planta. Por ejemplo, son más abundantes en plantas xerófitas, adaptadas a ambientes secos, debido a que los intercambios son intensos en pequeños espacios de tiempo, cuando hay humedad. La disposición de los estomas varía según sea mono o dicotiledónea. La acelga es una especie dicotiledónea por lo cual los estomas se distribuyen al azar sobre la superficie de la hoja. (Megías et al., 2020)

Los estomas son estructuras formados por las células oclusivas, forma arriñonada, bajo las cuales se encuentra la cavidad subestomática. Cuando las células oclusivas se separan dejan un orificio entre ellas denominado ostiolo (Ilustración 28) que comunica el medio externo con la cavidad subestomática (medio interno) Las células oclusivas se encuentran diseminadas entre las células epidérmicas, pudiendo situarse a tres niveles distintos Pueden situarse al mismo nivel, por encima o por debajo de las epidérmicas. En el caso de la hortícola de hoja acelga las células oclusivas se encuentran sobresalidas de las epidérmicas. Mayoritariamente, aunque en la Ilustración 28 no se aprecie, las células oclusivas están rodeadas por un número variable de células anexas, se diferencian de las oclusivas porque son de morfología y tamaño distintos. (Megías et al., 2020)

También se puede observar que próximo al estoma parece que hay una bacteria con forma de bacilo, sin embargo, no se puede confirmar con certeza que sea una bacteria y que además sea la *M. Symbioticum*.

4 CONCLUSIONES

Tras todo el estudio, se va concluir si se ha alcanzado tanto el objetivo general como los objetivos específicos:

1. El montaje y manejo de las mesas de hidroponía “Minicamp” se ha realizado satisfactoriamente, a pesar de ser un sistema con el que no se había trabajado previamente. No obstante, es un sistema que requiere mucha implicación ya que tiene problemas de diseño que hace que se generen fugas. Estas fugas hacen que las mesas se queden sin solución nutritiva por lo cual es necesario visitar las instalaciones diariamente para comprobar que el sistema tiene solución nutritiva y que las plantas no sufran daños. A su vez, las hortalizas de hoja ancha (borraja, acelga y espinaca) se adaptaron al sistema hidropónico sin ninguna dificultad. Por ello, consideramos que las mesas han sido útiles para poder testar el producto, pero son muy poco prácticas para utilizarlas de forma continuada.
2. Con los resultados obtenidos, no se ha visto que el bioestimulante BlueN® tenga ningún efecto positivo sobre las plantas tratadas de borraja y acelga frente a las control.
3. Tras el estudio de microscopia electrónica de barrido, se observa que el día que se tomaron las muestras de material vegetal (acelga y borraja) correspondiente al día 79 del experimento, no se ven indicios de la colonización de la bacteria *Methylobacterium Symbioticum*. Esto nos hace sugerir dos opciones: i) en ningún momento ha habido colonización por parte del endófito en las hortalizas de hoja o ii) al alcanzar las hortalizas un desarrollo vegetativo avanzado la colonización no prosperó y paró su desarrollo. La primera opción parece la más lógica ya que en los resultados de los parámetros fisiológicos y de crecimiento tampoco se ve que el endófito tenga ningún efecto a lo largo del periodo de crecimiento. Esto nos hace plantearnos cuál ha podido ser el problema por el cual la colonización no se ha realizado. En todo momento se siguieron los parámetros establecidos por la ficha técnica del bioestimulante, por tanto, consideramos que se

debería de realizar otro segundo ensayo para poder respaldar los resultados obtenidos en el presente estudio.

4. La aplicación de β -alanina sobre la superficie de las hojas 24 horas antes de la aplicación de la bacteria *M. symbioticum* no se ha visto que haya mejorado ni aumentado el grado de colonización en las hortalizas de invierno.
5. Tras el estudio realizado, con todo se puede determinar que con la aplicación del bioestimulante BlueN® no es posible la sustitución ni total ni parcial del abonado nitrogenado mineral por abono biológico.

Es necesario que la agricultura evolucione a una agricultura más sostenible con el objetivo de reducir los impactos medioambientales que actualmente se están ocasionando. Por ello, es importante seguir investigando en nuevos productos que no generen o generen el menor impacto posible sobre el medio ambiente, uno de estos productos podría ser los bioestimulantes.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Miembros Comité Científico., A. M., Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Comité Científico., M. R., Nerín de la Puerta, C., Pla Martínez, A., & López Rodríguez, R. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España. *Revista Del Comité Científico de La AESAN, ISSN 1885-6586, N° 14, 2011, Págs. 65-88, 14, 65-88*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3772274>
- AlgaEnergy líder en la biotecnología de las microalgas.* (n.d.). Retrieved May 27, 2021, from <https://www.algaenergy.es/noticias/>
- Antón, A., & Lizaso, J. (2001). Nitritos, Nitratos Y Nitrosaminas. *Fundación Ibérica Para La Seguridad Alimentaria*, 1-25.
- Assainar, S. K., Abbott, L. K., Mickan, B. S., Whiteley, A. S., Siddique, K. H. M., & Solaiman, Z. M. (2018). Response of wheat to a multiple species microbial inoculant compared to fertilizer application. *Frontiers in Plant Science*, 871, 1601. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01601>
- Benimeli, M. F., Plasencia, A., Corbella, R. D., Andina Guevara, D., Sanzano, A., Sosa, F. A., & Fernández de Ullivari, J. (2019). El nitrógeno del suelo. *Universidad Nacional de Tucumán*, 1-11. <https://www.edafologia.org/app/download/7953478176/El+nitrogeno+del+suelo+2019.pdf?t=1563476239>
- BlueN - Hacia una revolución agrícola - Methylobacterium symbioticum.* (n.d.). Retrieved May 25, 2021, from <https://symborg.com/es/download/bluen-revolucion-agricola-methylobacterium-symbioticum/>
- BlueN – Ficha Técnica (LATAM) - Symborg.* (n.d.). Retrieved May 25, 2021, from <https://symborg.com/es/download/chile-bluen-ft/>
- Bonanse, M., Ledesma, C., Rodriguez, C., & Delgado, A. R. S. (2014). A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445-458. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Carrasco, G., Profesor, P. D., & Izquierdo, J. (1996). *MANUAL TECNICO LA EMPRESA HIDROPONICA DE MEDIANA ESCALA: LA TECNICA DE LA SOLUCION NUTRITIVA RECIRCULANTE ("NFT") Oficial Regional de Producción Vegetal Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe OFICINA REGIONAL DE LA FAO PARA AMERICA LAT.*
- Carrillo, D. M. Á. F., & D. Alfredo Soria Alfonso. (n.d.). *La contaminación de las aguas por nitratos procedentes de fuentes de origen agrario.* Retrieved May 17, 2021, from [https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=8996&IDTIPO=246&RASTRO=c226\\$m1259,20559](https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=8996&IDTIPO=246&RASTRO=c226$m1259,20559)
- da Cunha, A. R., Katz, I., de Pádua Sousa, A., & Uribe, R. A. M. (2015). SPAD index according growth and development of lisianthus plants in relation to different nitrogen levels under protected environment. *Idesia*, 33(2), 97-105. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292015000200012>

- Directiva 91/676/CEE, de 12 de diciembre, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura.(1991)*Boletín Oficial del Estado*. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1991-82066>
- Directiva 80/778/CEE del Consejo, de 15 de julio, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano(1980) *Boletín Oficial del Estado*. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1998-82174>
- Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S. L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., & Roupael, Y. (2018). Trichoderma-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Frontiers in Plant Science*, 9, 743. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00743>
- García-Rodríguez, A., García-Rodríguez, S., Díez-Mediavilla, M., & Alonso-Tristán, C. (2020). Photosynthetic active radiation, solar irradiance and the cie standard sky classification. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(22), 1–14. <https://doi.org/10.3390/app10228007>
- Giménez, C. M. (2020). *La Borraja*, una planta emblemática de Aragón
- Green, P. N. (2015). *Methylobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00830>
- Kim, S. H., Fisher, P. R., & Lieth, J. H. (2007). Analysis and modeling of gas exchange processes in *Scaevola aemula*. *Scientia Horticulturae*, 114(3), 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.013>
- Macua, J. I., Lahoz, I., Betelu, F., Díaz, E., & Calvillo, S. (2007). *NAVARRA AGRARIA Acelga*.
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2014). Tejidos Vegetales: Conducción. *Atlas de Histología Animal y Vegetal*, 1–18. <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/v-sosten.pdf>
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2020). Tejidos vegetales de protección. *Atlas de Histología Animal y Vegetal*, 1–14. <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/v-sosten.pdf>
- Meier, U., Enz, M., Dachler, C., Bleiholder, H., Buhr, L., Feller, C., Hack, H., Hess, M., Klose, R., Stauss, R., Van den Boom, T., & Weber, E. (1998). Compendio para la identificación de los estadios fenológicos de especies mono- y dicotiledóneas cultivadas. Escala BBCH extendida. *Compendio Para La Identificación de Los Estadios Fenológicos de Especies Mono- y Dicotiledóneas Cultivadas Escala BBCH Extendida*, 1–123.
- Minicamp. (n.d.). Retrieved May 17, 2021, from <http://www.minicamp.com.es/minicamp/>
- Olaetxea, M., Mora, V., Bacaicoa, E., Garnica, M., Fuentes, M., Casanova, E., Zamarreño, A. M., Iriarte, J. C., Etayo, D., Ederri, I., Gonzalo, R., Baigorri, R., & García-Mina, J. M. (2015). Absciscic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiology*, 169(4), 2587–2596. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00596>
- Orden Foral 247/2018 de 4 de octubre, de la Consejera de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local por la que se revisan las zonas vulnerables a la contaminación de las aguas por nitratos procedentes de fuentes agrarias y se aprueba el programa de actuaciones para el periodo 2018-2021.(2018). *Boletín Oficial de Navarra*. <https://bon.navarra.es/es/anuncio/-/texto/2018/206/0/>
- Pascual, J. A., Ros, M., Martínez, J., Carmona, F., Bernabé, A., Torres, R., Lucena, T., Aznar, R., Arahál, D. R., & Fernández, F. (2020). *Methylobacterium symbioticum* sp. nov., a new species isolated from spores of *Glomus iranum* var. *tenuiphyarum*. *Current Microbiology*, 77(9), 2031–2041. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02101-4>
- Perdomo, C., & Barbazán, M. (2007). Nitrógeno. *Área De Suelos Y Aguas*, 1, 74. <http://www.fagro.edu.uy/~fertilidad/publica/Tomo N.pdf>
- Portal de apoyo a las políticas y la gobernanza (FAO). (n.d.). Retrieved May 17, 2021, from <http://www.fao.org/policy-support/policy-themes/sustainable-intensification-agriculture/es/>
- Radiación solar - Meteo Navarra. (n.d.). Retrieved May 25, 2021, from http://meteo.navarra.es/definiciones/radiacion_solar.cfm
- Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias.(1996). *Boletín Oficial del Estado*. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1996-5618>
- Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes.(2013) *Boletín Oficial del Estado*. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2013-7540>

- Reglamento (CE) nº 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a los abonos.(2003) *Boletín Oficial del Estado* <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2003-81869>
- Sestili, F., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Pucci, A., Bonini, P., Canaguier, R., & Colla, G. (2018). Protein hydrolysate stimulates growth in tomato coupled with N-dependent gene expression involved in N assimilation. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1233. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01233>
- Urakami, T., & Komagata, K. (1984). *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2), 188–201. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-188>
- Verhulst, N., François, I., Grahmann, K., Cox, R., & Govaerts, B. (2014). *Eficiencia del uso de nitrógeno y optimización de la fertilización nitrogenada en la agricultura de conservación. February 2019.*
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L. J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J. A., De Vries, W., Majele Sibanda, L., ... Murray, C. J. L. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, 393(10170), 447–492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4)
- Yoshida, Y., Iguchi, H., Sakai, Y., & Yurimoto, H. (2019). Pantothenate auxotrophy of methylobacterium spp. Isolated from living plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 83(3), 569–577. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1549935>

Anexo 1: Estadística ANOVA dos vías y una vía.

1. ANOVA una vía (Control vs β - alanina)

En las comparaciones estadísticas lo primero que se hizo tanto para borraja y para acelga fue determinar si la β - alanina tenía algún efecto positivo sobre el material vegetal. Para ello, se realizaron dos ANOVAS en cada especie una para los tratamientos con endófito y otra para los tratamientos sin endófito comparando los tratamientos control frente a los de β - alanina. Esto se realizó para los parámetros: peso parte aérea, peso raíz, peso total y ratio raíz/parte aérea.

1.1 Acelga

a. Tratamientos sin endófito

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	185,474 ^a	1	185,474	2,962	,099
	R	93,743 ^b	1	93,743	1,027	,322
	PESO_TOTAL	542,935 ^c	1	542,935	2,060	,165
	RATIO	,023 ^d	1	,023	,382	,543
Intersección	PA	15874,790	1	15874,790	253,483	<,001
	R	1664,103	1	1664,103	18,223	<,001
	PESO_TOTAL	27818,442	1	27818,442	105,572	<,001
	RATIO	1,836	1	1,836	31,029	<,001
ALANINA	PA	185,474	1	185,474	2,962	,099
	R	93,743	1	93,743	1,027	,322
	PESO_TOTAL	542,935	1	542,935	2,060	,165
	RATIO	,023	1	,023	,382	,543

Ilustración A1. ANOVA una vía entre el tratamiento con β - alanina y control (ambos sin tratamiento endófito) para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de acelga crecidas en condiciones de bajo nitrógeno.

b. Tratamientos con endófito

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	5,201 ^a	1	5,201	,206	,654
	R	16,588 ^b	1	16,588	,424	,522
	PESO_TOTAL	40,365 ^c	1	40,365	,348	,561
	RATIO	,025 ^d	1	,025	,728	,402
Intersección	PA	12705,267	1	12705,267	502,265	<,001
	R	951,107	1	951,107	24,294	<,001
	PESO_TOTAL	20608,801	1	20608,801	177,608	<,001
	RATIO	1,482	1	1,482	42,530	<,001
ALANINA	PA	5,201	1	5,201	,206	,654
	R	16,588	1	16,588	,424	,522
	PESO_TOTAL	40,365	1	40,365	,348	,561
	RATIO	,025	1	,025	,728	,402

Ilustración A2.ANOVA una vía entre el tratamiento con β - alanina y control (ambos con tratamiento endófito) para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de acelga crecidas en condiciones de bajo nitrógeno.

Como se puede observar en las Ilustraciones A1 y A2 no se aprecian diferencias significativas en acelga ni en los tratamientos con endófito ni en los que no tienen endófito. En la Ilustración A1 se observa que la significancia es de 0,99 en la PA lo que nos indica que hay cierta tendencia a que la β - alanina ha generado más parte aérea que el control.

1.2 Borraja

a. Tratamientos sin endófito

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	38,969 ^a	1	38,969	,233	,632
	R	51,362 ^b	1	51,362	,239	,627
	PESO_TOTAL	,854 ^c	1	,854	,001	,972
	RATIO	,146 ^d	1	,146	1,094	,301
Intersección	PA	22166,358	1	22166,358	132,593	<,001
	R	11766,901	1	11766,901	54,811	<,001
	PESO_TOTAL	66233,681	1	66233,681	96,476	<,001
	RATIO	18,579	1	18,579	139,061	<,001
ALANINA	PA	38,969	1	38,969	,233	,632
	R	51,362	1	51,362	,239	,627
	PESO_TOTAL	,854	1	,854	,001	,972
	RATIO	,146	1	,146	1,094	,301

Ilustración A3.ANOVA una vía entre el tratamiento con β - alanina y control (ambos sin tratamiento endófito) para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno.

b. Tratamientos con endófito

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	70,678 ^a	1	70,678	,313	,579
	R	89,371 ^b	1	89,371	,197	,659
	PESO_TOTAL	1,095 ^c	1	1,095	,001	,975
	RATIO	,311 ^d	1	,311	,951	,335
Intersección	PA	24263,272	1	24263,272	107,473	<,001
	R	17809,012	1	17809,012	39,312	<,001
	PESO_TOTAL	83646,549	1	83646,549	73,008	<,001
	RATIO	23,361	1	23,361	71,342	<,001
ALANINA	PA	70,678	1	70,678	,313	,579
	R	89,371	1	89,371	,197	,659
	PESO_TOTAL	1,095	1	1,095	,001	,975
	RATIO	,311	1	,311	,951	,335

Ilustración A4.ANOVA una vía entre el tratamiento con β - alanina y control (ambos sin tratamiento endófito) para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno.

Como se puede observar en las Ilustraciones A3 y A4 no se aprecian diferencias significativas en borraja ni en los tratamientos con endófito ni en los que no tienen endófito.

2 ANOVA una vía (β - alanina+ Endófito vs β - alanina + Control)

En las comparaciones estadísticas lo segundo que se hizo fue comprobar si la β - alanina tenía algún efecto positivo sobre la colonización del endófito, es decir, si hay diferencias significativas entre el endófito y el control ambos con un previo tratamiento de β - alanina. Para ello, se realizó un ANOVA en cada especie una para el tratamiento endófito frente al control. Esto se realizó para los parámetros: peso parte aérea, peso raíz, peso total y ratio raíz/parte aérea.

2.1 Acelga

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	245,260 ^a	1	245,260	5,043	,035
	R	146,750 ^b	1	146,750	1,644	,213
	PESO_TOTAL	771,442 ^c	1	771,442	3,191	,088
	RATIO	,055 ^d	1	,055	,990	,331
Intersección	PA	15364,422	1	15364,422	315,902	<,001
	R	1471,600	1	1471,600	16,491	<,001
	PESO_TOTAL	26346,076	1	26346,076	108,990	<,001
	RATIO	1,617	1	1,617	29,247	<,001
ENDO	PA	245,260	1	245,260	5,043	,035
	R	146,750	1	146,750	1,644	,213
	PESO_TOTAL	771,442	1	771,442	3,191	,088
	RATIO	,055	1	,055	,990	,331

Ilustración A5. ANOVA una vía entre el tratamiento con endófito y control (ambos con tratamiento de β - alanina) para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno.

En la Ilustración A5 se aprecia que únicamente hay diferencias significativas en la PA (parte aérea), sin embargo, haciendo un estadístico descriptivo se pudo determinar que había generado más parte aérea los tratamientos control que los de β - alanina. Esto es indicativo que la β - alanina no favoreció si no que empeoró el desarrollo de la acelga.

2.2 Borraja

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	20,464 ^a	1	20,464	,107	,745
	R	128,688 ^b	1	128,688	,530	,470
	PESO_TOTAL	251,788 ^c	1	251,788	,324	,572
	RATIO	,030 ^d	1	,030	,232	,632
Intersección	PA	25488,119	1	25488,119	132,883	<,001
	R	12690,626	1	12690,626	52,315	<,001
	PESO_TOTAL	74148,742	1	74148,742	95,500	<,001
	RATIO	16,823	1	16,823	129,566	<,001
ENDO	PA	20,464	1	20,464	,107	,745
	R	128,688	1	128,688	,530	,470
	PESO_TOTAL	251,788	1	251,788	,324	,572
	RATIO	,030	1	,030	,232	,632

Ilustración A6. ANOVA una vía entre el tratamiento con endófito y control (ambos con tratamiento de β - alanina) para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de borraja crecidas en condiciones de bajo nitrógeno.

Como se puede observar en las Ilustración 6 no se aprecian diferencias significativas en borraja.

3 ANOVA dos vías (Endófito vs Control)

Tras realizar la ANOVA de una vía donde se comparó el efecto de la β - alanina frente a su control (*ver apartado 1*) y ver que no tenía ningún efecto. Se decidió incorporar los datos de la β - alanina a los control de tal forma que se englobaron los datos de β - alanina a los control y los datos de β - alanina + endófito a los control + endófito. Tras este proceso se realizó una ANOVA de dos vías comparando los tratamientos nitrogenados (alto y bajo) y los endófito (con y sin) para los parámetros: peso parte aérea, peso raíz, peso total y ratio raíz/parte aérea.

3.1 Acelga

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	10002,038 ^a	3	3334,013	12,535	<,001
	R	59,884 ^b	3	19,961	,335	,800
	PESO_TOTAL	10008,581 ^c	3	3336,194	6,730	<,001
	RATIO	,331 ^d	3	,110	3,446	,021
Intersección	PA	87150,464	1	87150,464	327,660	<,001
	R	3334,017	1	3334,017	55,943	<,001
	PESO_TOTAL	124576,189	1	124576,189	251,297	<,001
	RATIO	2,419	1	2,419	75,667	<,001
ENDO	PA	130,599	1	130,599	,491	,486
	R	33,615	1	33,615	,564	,455
	PESO_TOTAL	296,729	1	296,729	,599	,442
	RATIO	,005	1	,005	,159	,691
N	PA	9765,394	1	9765,394	36,715	<,001
	R	1,826	1	1,826	,031	,862
	PESO_TOTAL	9500,139	1	9500,139	19,164	<,001
	RATIO	,320	1	,320	9,996	,002
ENDO * N	PA	1,783	1	1,783	,007	,935
	R	7,998	1	7,998	,134	,715
	PESO_TOTAL	17,333	1	17,333	,035	,852
	RATIO	,003	1	,003	,103	,749

Ilustración A7. ANOVA dos vías entre el tratamientos con endófito y control y tratamientos alto y bajo N para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de acelga.

3.2 Borraja

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PA	46735,992 ^a	3	15578,664	10,242	<,001
	R	395,954 ^b	3	131,985	,330	,803
	PESO_TOTAL	49011,699 ^c	3	16337,233	5,336	,002
	RATIO	4,235 ^d	3	1,412	8,912	<,001
Intersección	PA	217634,202	1	217634,202	143,086	<,001
	R	41210,168	1	41210,168	103,161	<,001
	PESO_TOTAL	448251,255	1	448251,255	146,399	<,001
	RATIO	30,711	1	30,711	193,885	<,001
ENDO	PA	525,353	1	525,353	,345	,558
	R	7,153	1	7,153	,018	,894
	PESO_TOTAL	409,906	1	409,906	,134	,715
	RATIO	,091	1	,091	,576	,449
N	PA	45903,539	1	45903,539	30,180	<,001
	R	7,563	1	7,563	,019	,891
	PESO_TOTAL	47089,511	1	47089,511	15,379	<,001
	RATIO	4,102	1	4,102	25,894	<,001
ENDO * N	PA	833,890	1	833,890	,548	,460
	R	313,641	1	313,641	,785	,377
	PESO_TOTAL	2170,356	1	2170,356	,709	,401
	RATIO	,013	1	,013	,083	,774

Ilustración A8 ANOVA dos vías entre el tratamientos con endófito y control y tratamientos alto y bajo N para los parámetros fisiológicos de: peso PA (parte aérea). Peso R (raíz), Peso total (parte aérea + raíz) y Ratio R/PA, en plantas de borraja.

En las Ilustraciones A7 y A8 se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre el endófito y el control. Únicamente se aprecian diferencias significativas como era de esperar, entre los tratamientos con alto y bajo N. A simple vista en el invernadero ya se veía que se había habido un crecimiento vegetativo mayor en las de alto N que en las de bajo.